



TITLE:

大腸菌における染色体複製開始の
制御機構の分子遺伝学的解析(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

片山, 勉

CITATION:

片山, 勉. 大腸菌における染色体複製開始の制御機構の分子遺伝学的解析. 京都大学, 1990, 理学博士

ISSUE DATE:

1990-11-24

URL:

<https://doi.org/10.11501/3084326>

RIGHT:

学 位 申 請 論 文

片 山 勉

大腸菌における染色体複製開始の
制御機構の分子遺伝学的
解析

生物物理学専攻

片山勉

要旨

大腸菌の染色体複製の開始反応は、複製周期を制御する段階であり細胞周期との共役のためもっとも重要な調節機能を担っている。現在、開始反応に対して制御機能を持つことがわかっている蛋白質は、唯一、DnaA 蛋白質である。DnaA 蛋白質は染色体複製起点 *oriC* に結合し、開始反応の引き金として機能する。*in vivo* においては、DnaA 蛋白質の量的変化によって複製開始頻度が設定されうることが示されている。一方、*in vitro* では DnaA 蛋白質の質的な状態変化が複製開始活性に影響を及ぼすことが示された。しかし、*in vivo* ではそのような調節系の存在は示されていなかった。

申請者は、*in vivo* における DnaA 蛋白質 (*dnaA* 遺伝子) による新しい複製開始制御を調べるため、GroE 蛋白質 (GroEL 蛋白質と GroES 蛋白質) の大量供給による、高温感受性 *dnaA46* 変異の抑制系を利用した。この様な抑制株は高温耐性を獲得すると同時に低温感受性となることが知られていた。この低温感受性に注目して行った解析の結果と考察をまとめて以下に示す。

(1) 問題の低温感受性は λ フェージ上の野生型 *dnaA*⁺ 遺伝子の導入によって失われない。つまり、低温感受性に関して *dnaA46* 変異は優性で

ある。

(2) 問題の低温感受性は、*oriC* にも DnaA 蛋白質にも依存しない染色体複製系（安定DNA複製）の導入によっても解消しない。

以上2つの事実より、低温において増殖に対する積極的な阻害機構があることが示唆され、よって、低温でも GroE 蛋白質と DnaA 蛋白質が相互作用している可能性が考えられる。

(3) 高温で増殖中の抑制株を低温に移行すると、蛋白質合成に依存しないで、染色体が過剰に複製する。少なくとも低温移行時から4時間、増加し続け、総DNA量は移行時の4倍量を越した。

(4) この過剰複製はリファンピシン感受性である。特に、開始反応が阻害されると思われ、*oriC* での開始反応の特性と一致する。

(5) *oriC*, *terC* (複製終結点) の遺伝子量を定量して、過剰複製時における時間的变化を求めたところ、*oriC* 部位からの複製開始が裏付けられた。

また、(4), (5) の結果からは、4時間の間に、新たな複製開始が繰り返し起こっていることが示唆された。

(6) イムノブロットイング法により定量された、抑制株での DnaA 蛋白質量は野生株と実質的に変わらなかった。

この事実は、*in vivo* における開始制御において、少なくとも、

DnaA 蛋白質の量による調節が唯一であることを示す。

GroE 蛋白質は、いわゆる「シャペロン」蛋白質であり、蛋白質の折りたたみ構造の維持を補助する。これを基に、DnaA 蛋白質の特異な高次構造による複製開始の制御のモデルを提唱した。

ところで、大腸菌にはRNase H (*rnh* 遺伝子) 欠損下で、DnaA 蛋白質にも *oriC* にも依存しない複製系、安定DNA複製が構成的に発現する。安定DNA複製の開始は蛋白質合成にも非依存である。この複製系の開始反応の分子機構に関しては、ほとんど未解明のまま残されている。ここでは、開始機構を知る端緒を得るため、*dnaA rnh* 二重欠損条件下で宿主に致死性を与えるプラスミドの解析を行なった。まずこのプラスミドが安定DNA複製を阻害することを明らかにした。次に、プラスミド上の阻害因子を詳細に解析することにより、 β -ラクタマーゼの大量発現が安定DNA複製阻害の主原因であることが判明した。また、宿主変異による復帰変異株を分離し解析した。染色体由来のあるDNA断片は問題の致死性に対する、マルチコピーサプレッサーとなることが示唆された。

目次

序章	
序論	1
第1章 「DnaA 蛋白質の過剰供給と蛋白質合成に依存しない、染色体複製の過剰開始」	
結果	12
第1節 GroE 蛋白質過剰供給によって起こる、 <i>dnaA46</i> 変異株の低温感受性は優性形質である	
第2節 <i>oriC</i> に依存しない染色体複製系の導入によって、pGroEによる <i>dnaA46</i> 変異抑制株の低温感受性は失われない	
第3節 pGroEにより抑制された <i>dnaA46</i> 株における、低温特異的な染色体の過剰複製	
第4節 過剰複製の開始反応の転写反応に依存する	
第5節 過剰開始は <i>oriC</i> 部位から起こっている	
第6節 過剰開始はDnaA 蛋白質の量的増加によるものではない	
考察	29
第1節 pGroEの形質転換によって発現する、 <i>dnaA46</i> 株の低温感受性	
第2節 pGroEを持つ <i>dnaA46</i> 株で低温特異的に起こる、染色体の過剰複製	
第3節 過剰複製の転写依存性	
第4節 過剰開始の様式	
第5節 過剰開始はDnaA 蛋白質量の過剰供給を伴っていない	
第6節 <i>dnaA46</i> (<i>Cos</i>) 変異による過剰開始との比較	
第7節 過去に観察された、高温感受性 <i>dnaA</i> 変異による過剰開始	
第8節 GroE 蛋白質の機能から見た、変異DnaA 蛋白質の過剰開始に対する挙動	
第2章 「β-ラクタマーゼの過剰供給は安定DNA複製を阻害する」	
結果	38
第1節 mini-F-pBR322 複合プラスミドpZK58 は、高温での <i>dnaA rnh</i> 二重欠損株の増殖を阻害する	

第 2 節	pZK58 は <i>rnh</i> 欠損株の安定DNA複製を阻害する	
第 3 節	mini-F 断片上における、YT297 株に対する増殖阻害因子	
第 4 節	pBR322 上における、YT297 株に対する増殖阻害因子	
第 5 節	<i>sopA</i> プロモーターを持つプラスミドによる安定DNA複製の阻害	
第 6 節	<i>lac</i> プロモーターを持つpBR322 由来プラスミドによる安定DNA複製の阻害	
第 7 節	抑制変異株の分離と解析	
考察		52
第 1 節	mini-F-pBR322 複合プラスミドによるYT297株の高温致死	
第 2 節	大量供給された β -ラクタマーゼによる安定DNA複製の阻害	
第 3 節	抑制変異株の分離と解析	
材料と方法		55
文献		62
謝辞		

序 章

序論

大腸菌の染色体複製は、開始反応、伸長反応、終結反応の3反応に区分される。通常、開始反応は複製起点 *oriC* で起こり、両方向に新生DNAの合成が進む。特にこの開始反応は複製周期を制御する段階であり、開始反応の周期的制御は細胞周期との共役のためもっとも重要な調節機能を担っているに拘わらず、その分子メカニズムの解明は極くわずかしかな進んでいない[79]。

1963年、Jacobらは、レプリコンモデル（図1）という非常に画期的な制御モデルを提出した[35]。彼らは、自律複製単位をレプリコンと名付け、複製開始に必要なイニシエーター蛋白質、イニシエーターが結合し複製開始に *cis* に働く領域レプリケーターを仮定した。ここでは、複製開始はイニシエーターによる正の制御を受けるのである。現在まで、大腸菌のDNA複製制御の研究においては、その多くが、基礎的制御構造としてのレプリコンモデルに、何らかの関わりを持ってきた。

大腸菌の染色体複製機構がレプリコンモデルに適合する部分は、まず、複製開始に *cis* に働くレプリケーターとして、複製起点 *oriC*（図2）が特定されていることである[86]。*oriC* は通常、染色体上唯一の複製起点であり、この領域を含む制限酵素断片はプラスミドとして自律複製しうる[84]。

一方、イニシエーターとして、現在まで、ただ1つの候補となってきた蛋白質はDnaAである[22、32]。DnaA蛋白質は複製開始に特異的に作用し、*oriC* 内に4か所の特異的な塩基配列（DnaA Box）を認識して結合する[21、56]。

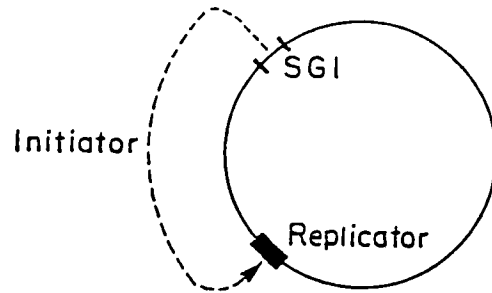


図1 レプリコン・モデル

イニシエーター蛋白質による正の自律的制御を表わす。SGI はイニシエーター構造遺伝子を示す。文献より[33]転載。

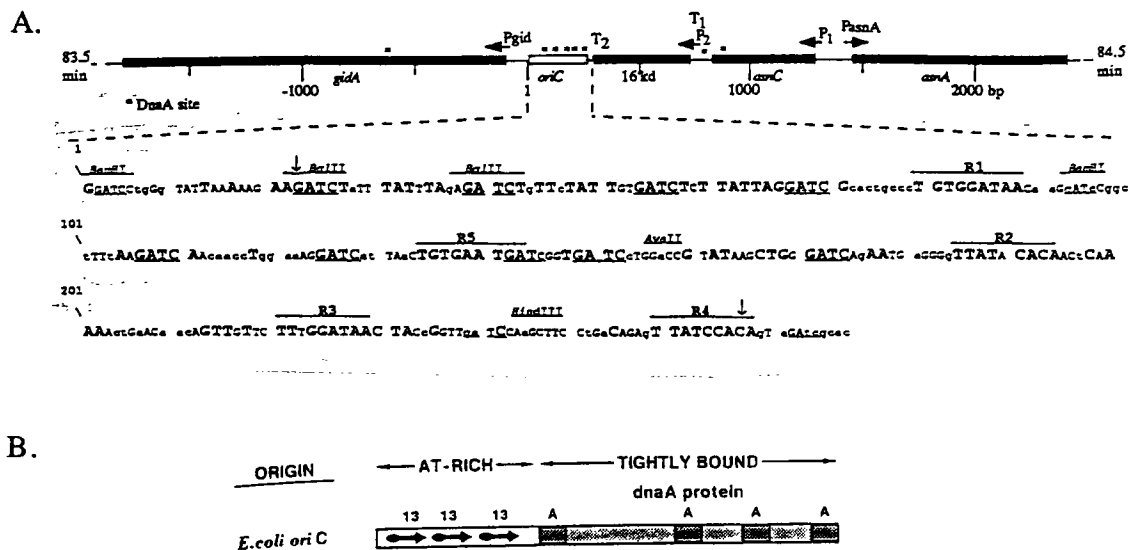


図2 *oriC* の塩基配列と*oriC* 周辺の構造

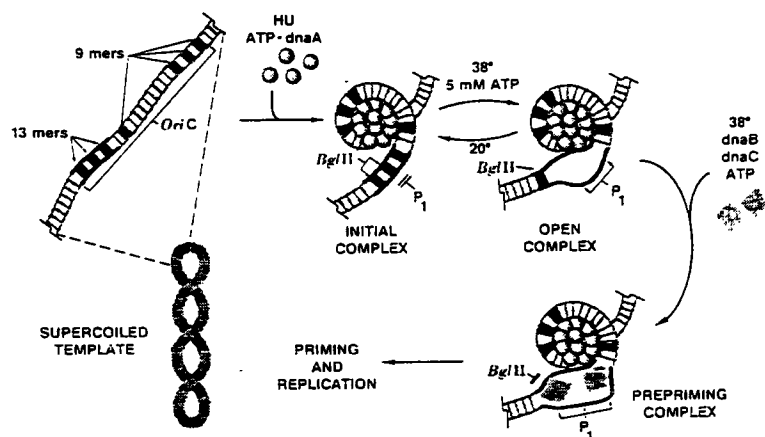
A. の下図においてはminimal-*oriC* の塩基配列を示した。2つの下向き矢印の間が最小配列。文献[86]より改変して転載。

B. では、minimal-*oriC* の構造の特徴を模式的に示した。13はATに富む13-mer 配列、AはDnaA-Box を示す。文献[10]より改変して転載。

DnaA蛋白質は、まさに、複製開始の引き金として機能することが、*in vitro* の再構成実験系の詳細な研究から明らかとなった（図3）。DnaAは*oriC* に結合すると、*oriC* 内左側に3回連続して存在するATに富む配列（13-mer 配列）をわずかに開裂させる[9]。この複合体に、DnaB（ヘリカーゼ）、DnaCが作用してさらに開裂部分を広げ、生じた一本鎖DNA上にDnaG（プライマーゼ）によってプライマーが形成される[4]。そして、ここでのヌクレオチド重合反応を境界にして伸長過程に移行するのである（複製に関与する遺伝子を表1にまとめた）[57]。DnaA蛋白質がイニシエーターとして考えられるのは、*oriC* に結合すること以外に、DNA複製に特異的に関与し、しかも、開始反応のみに必須となる、ただ1つの蛋白質であることが、第1の理由である。

ところで、大腸菌の分裂周期において、染色体の複製開始は、開始点当たりの細胞質量がある一定の値に達したときに起こる。このときの細胞質量を、開始質量（initiation mass）と言う[16]。この開始質量の観察とレプリコン説とを合わせて考えるならば、もっとも単純なモデルは、イニシエーターは細胞質量の増加と比例して細胞内に蓄積していくとすることである。そのためにはイニシエーターは細胞内で一定濃度に保たれていなければならない。実際に、*dnaA* 遺伝子は自己産物によって負の制御（autoregulation）を受けていることが明らかとなった[1、11、48、80]。また、DnaA蛋白質は、菌の分裂周期を通じて一定の割合で合成され続け、安定に存在するため、直線的に蓄積し続けると推測される[68]。これらは、先の条件によく合う。

さらに、分裂速度が高い培養条件では細胞内のDnaA量も多いこと[12]、また、DnaA蛋白質を過剰供給すると、*oriC* の開始頻度が上がることが示され[2、66、81]、DnaAがイニシエーターであることを暗示した。加えて、DnaA蛋白質を過剰供給した場合、開始質量が減少する



3 oriC における開始反応

DnaA 蛋白質は4つの9-mer 配列 (DnaA Box) に結合して、開始複合体を形成する。次に、13-mer 配列を開裂させる。文献[9]より転載。

表 1 DNA複製の必須蛋白質

Protein	Primary function	Polypeptide mass (kilodaltons)	No. of subunits in native protein	Molecules per cell	Gene	Map position (min)	Phenotype of mutant
DnaA	Origin recognition	52.5	1	200	<i>dnaA</i>	83	Slow stop
DnaB	DNA helicase; priming	52.3	6	20	<i>dnaB</i>	92	Quick stop
DnaC	Delivery of dnaB protein to <i>oriC</i>	29	1	100	<i>dnaC</i>	99	Slow or quick stop
SSB	Binding to ssDNA	18.8	4	500	<i>ssb</i>	92	Quick stop
primase	RNA primer synthesis	65.6	1	75	<i>dnaG</i>	67	Quick stop
DNA polymerase III (holoenzyme)	Replicative DNA polymerase	(740)		20			
α	DNA polymerase	130	(2)		<i>polC</i> (<i>dnaE</i>)	4	Quick stop
ε	3' → 5' proofreading exonuclease	27.5	(2)		<i>dnaQ</i> (<i>mutD</i>)	5	Hypermutation
θ	Unknown	10	1		Unknown		
β	DNA polymerase accessory protein	40.6	(2)		<i>dnaN</i>	83	Quick stop
τ	DNA polymerase accessory protein	71.1	(2)		<i>dnaZX</i>	11	Quick stop
γ	DNA polymerase accessory protein	52			<i>dnaZX</i>	11	Quick stop
δ	DNA polymerase accessory protein	32			<i>dnaZX</i> (?)		Quick stop
DNA gyrase	DNA supercoiling; decatenation	374	4				
α	Nicking-closing	97	2	250	<i>gyrA</i>	48	Slow stop
β	ATPase	89.8	2	150	<i>gyrB</i>	83	Slow stop
DNA polymerase I	Primer removal; gap filling	102	1	300	<i>polA</i>	87	DNA repair defective
DNA ligase	Sealing of DNA nicks	74	1	300	<i>lig</i>	52	Accumulate nascent fragments
DnaT	Termination of DNA replication	19.3	3	75	<i>dnaT</i>	99	Slow stop
RNA polymerase	Transcriptional activation of <i>oriC</i>	460	5	3,000	<i>rpoA, B, C, D</i>	73, 90, 90, 67	Slow stop

文献[57]より転載

ことが示された[53、73]。

以上のように、DnaAが複製開始頻度の決定因子であり、一面ではイニシエーターにふわしい性格を持つ、すなわち、その量に依存して開始の時期が（したがって、頻度が）自動的に決まってしまう機構が存在していることは確かであると思われる。にもかかわらず、単純にそれが唯一の制御機構であるとも思われない。その理由は、まず *oriC* プラスミドが宿主の *oriC* と共存して複製可能だからである[84]。しかもこの *oriC* プラスミドも正常な複製周期の制御下にあるらしい[52a]。*oriC* 配列はpBR322などの高コピー数プラスミドにクローン化されても宿主菌の成長を妨げない[74]。しかも、*oriC*-pBR322 複合プラスミドが *trans* にある場合、*dnaA* 遺伝子の転写量はせいぜい3倍程度しか増加していない[48]。これらは先の、開始質量の決定のモデルとの矛盾をはらんでいる。さらに、DnaA蛋白質が安定であることから細胞内で大きな量的変化はありそうもなく、分裂周期にしたがった、たかだか2倍程度の変化で十分な制御が可能であるのかという疑問も、決して無視できない[68]。

一方、*in vitro* において、再構成された複製系からは、さらに新しい、DnaA機能の制御があることが示された（図4）。まず、第1に、DnaA蛋白質はATP、ADPと強く結合することがわかった。それぞれの結合型は、DnaA蛋白質のDNAへの結合は同様に起こるが、13-mer配列の開裂と*oriC*の複製は、ATP結合型でのみ見られた[70]。次に、ADP結合型DnaAからのADPの解離が、膜成分であるカルディオリピンによって促進されることがわかった[71、85]。さらに同様な機能が、cAMPにもあることが明らかとなった[33]。これら、生化学的な研究の結果は*in vivo*においてもDnaA蛋白質の活性調節によって複製開始が制御されていることを無理なく想像させるものである。しかしながら*in vivo*

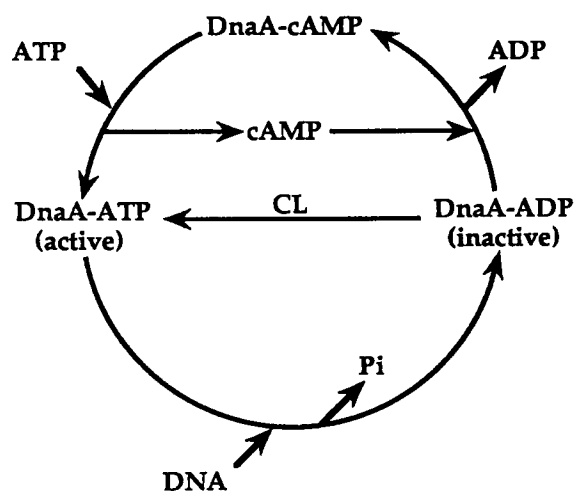


図4 DnaA 蛋白質の開始に関する
活性調節のモデル
文献[33]を基に改変を加えた。CL
はカルディオリピンを示す。

においてはDnaA 蛋白質の質的变化によって $oriC$ の開始頻度が制御されることを明確に示した研究はない。

本研究では、まず、 $oriC$ での複製開始頻度が顕著に増加しているにも拘わらず、DnaA 蛋白質の量に有意な増加はないという現象を見いだした。これは、*in vivo*においてもDnaA 蛋白質の質的变化によって $oriC$ の開始頻度が調節されうること示している。

ところで、特殊な遺伝的条件下では高温感受性 $dnaA$ 変異株の制限温度での細胞増殖も可能である。すなわち、染色体上で新たな複製起点が働く場合である。このような例には、プラスミドまたはファージ・レプリコンの染色体への組み込みによって高温感受性 $dnaA$ 変異株を高温耐性とするintegrative suppression と呼ばれる系と、RNase H欠損によってDnaA 蛋白質に依存しない、染色体上の新しい複製起点が活性化する安定DNA複製とがある。

上に述べた integrative suppressionを起こすプラスミドとして知られているのは、pBR322 (ColE1)、R1、R100.1、F、P1 などである[57]。これらには、DnaA 機能が完全に不要であるものと、そうでないものが

あることがわかっている。mini-R1プラスミドの染色体への組み込みは *dnaA* に全く依存しない染色体複製を可能とする。mini-R1プラスミドは、プラスミドとしての *in vivo* の複製時にも DnaA 蛋白質を必要としない。一方、F、P1のmini-プラスミドおよびR100.1プラスミドの組み込みによる *dnaA*(Ts) 変異抑制株には、*dnaA::Tn10* 変異を導入できない[42、63]。F、P1プラスミドの場合は、プラスミドとして自律複製するmini-プラスミドは高温感受性*dnaA* 変異株で高温では保持されない[27、42、62]にも拘わらず、同じ変異株で宿主染色体に組み込まれた場合は高温での宿主の増殖を可能とし、integrative suppression が起こる。Fプラスミドの場合は、異なる *dnaA* 変異の間で suppression の程度に差のあることから、変異DnaA 蛋白質の特定の残存活性が関与していることが暗示されている[45]。また、P1 プラスミド全体が組み込まれた場合にはDnaA 蛋白質にまったく依存せず高温での増殖が可能となる[27]。pBR322の場合はマルチコピープラスミドであるため、細胞質にもプラスミドが存在し、染色体DNA断片がプラスミド上にクローンされているときにintegrative suppression が起こるが、その頻度は低い[82]。*dnaA null* 変異株では調べられていない。

このように見ると、細胞増殖のためには、必ずしも *dnaA* と *oriC* が必要なわけではなく、低コピー数に抑制された複製起点が染色体にあれば十分のようである。ただしこのように抑制された菌の増殖速度は野生株に比べて低く、能率的な増殖のためには、*dnaA-oriC* 系が必要と思われる。

安定DNA複製 (SDR; stable DNA replication)は、クロラムフェニコールに非感受性の、すなわち、蛋白質合成に依存しない複製開始による、特殊な染色体複製機構である。*dnaA-oriC* 系の複製開始には蛋白質合成が必要である。SDR には、SOS 反応によって誘導される場合(iSDR;

表2 cSDRの多様な開始様式

<i>recA</i> 依存型	<i>rin⁻</i> 非依存	<i>recF</i> 非依存	<i>lexA3</i> で阻害されない
	<i>rin⁻</i> 依存	<i>recF</i> 依存	<i>lexA3</i> で阻害される
<i>recA</i> 非依存型			
	<i>rin⁻</i> 非依存	<i>recF</i> 非依存	<i>lexA(Def)</i> 依存

通常のcSDRは*recA*依存型である。*recA*欠損の場合、抑制変異として*rin-15*変異が分離された。このとき、cSDRは、*recF*に依存し、また、SOSレギュロンのスーパーリプレッサーとなる*lexA3*変異によって阻害される。ところが、リプレッサー活性を欠損する変異*lexA(Def)*が導入されると、*recA*, *rin-15*, *recF*に依存しないcSDRが可能となる。

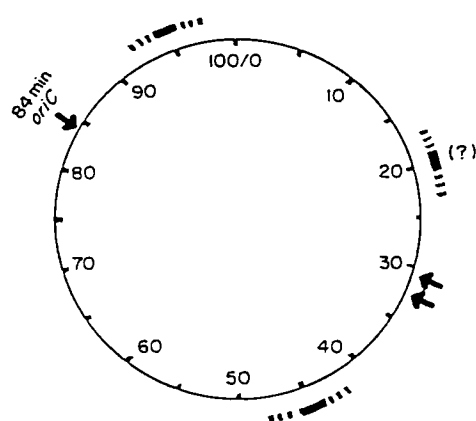


図5 推定された安定DNA複製の起点

染色体関連地図上に矢印と、太線で示した。文献[15]より転載。

induced SDR)[41]と、RNase Hの欠損 (*rnh* 遺伝子変異) によって構成的に発現する場合(cSDR; constitutive SDR)とがある。SDRの解析は、Kogoma 等が精力的に行なっており[44]、表2にまとめたような複製制御の多様性を持つ[76、77]。iSDRの開始には、DnaAが必要であり、*oriC* が機能しているかも知れない[6]。cSDRの開始には、DnaAも *oriC* も必要ない[47]。したがって、*dnaA* 変異株、*oriC* 欠損株は、*rnh* 変異の導入によって増殖可能となる。しかしながら、SDR の複製開始の詳細な機構はほとんどわかっていない。その最大の理由は、複製起点が単離、同定されていないことである。SDRは決して効率的な複製開始を行なっておらず、複製起点を自律複製するプラスミドとして確立するのが非常に困難なのである。ただし、*oriC* 欠損 *rnh* 変異株における相対的な遺伝子量の計測から、染色体上、4箇所から複製が開始することが示唆されている[15] (図5)。そのうち、もっとも活発と思われる2つは、通常は複製終結点となる *terC* 領域に存在している (以下、cSDR を安定DNA複製と記す)。

本論文においては、大腸菌染色体のDnaA 蛋白質による複製開始の制御機構を解析するため、また、安定DNA複製の開始機構を知る端緒を得るため、行なわれた以下の2つの研究を記述する。

(1) 「DnaA 蛋白質の過剰供給と蛋白質合成に依存しない、染色体複製の過剰開始」

DnaA 蛋白質の過剰供給によって *oriC* での複製開始頻度が増加することが明らかにされている[2、66、81]。これは、複製開始に対するDnaA 蛋白質の量的制御機構の存在を示唆するものである。一方、これまで、*in vivo* においてDnaA 蛋白質の質的变化が開始頻度の制御に積極的な関わりを持つことを示した研究はなかった。本研究に

においては、DnaA 蛋白質の過剰供給のない条件下で *oriC* において染色体複製の過剰開始がおこるという、非常に新奇な現象を見いだした。

高温感受性 *dnaA46* 変異は GroEL 蛋白質と GroES 蛋白質（以下、GroE 蛋白質と略記）の大量供給によって抑制されて高温耐性となり、かつ、低温感受性が付随して現われることが知られている[18、36]。申請者は、このように抑制された *dnaA46* 株では、低温において蛋白質合成非依存的に、染色体の過剰複製が *oriC* より起こることを見いだした。しかしながら、このとき、DnaA 蛋白質の過剰供給は起こっていなかった。本研究は、DnaA 蛋白質を増量させずとも過剰開始が起こることから、DnaA 蛋白質の量的調節のみによって *in vivo* の *oriC* での複製開始が制御されているのではない可能性を示した。また、GroE 蛋白質はいくつかの蛋白質の折りたたみ過程に積極的に関わる[7、23、24、51]。したがって、本研究の結果は、*in vivo* において、DnaA 蛋白質の特異的な立体構造の変化によって、DnaA 蛋白質の開始活性の制御が行なわれている可能性を示唆する。

(2) 「β-ラクタマーゼの大量供給は安定DNA複製を阻害する」

mini-F プラスミドは染色体あたり1から2コピーの低コピー数プラスミドであり、独自の複製開始因子(RepE 蛋白質)を持つ。ある mini-F-pBR322 複合プラスミドは、42°C で *dnaA* と *rnh* とが失活する株を高温感受性とすることが報告されていた。この株は高温では安定DNA複製によって染色体複製が賄われているはずである。また、同時に、この複合プラスミドの高温致死性はmini-F の複製起点と RepE蛋白質に依存すると報告され、したがって、mini-F 複製と安定DNA複製の開始に必要な因子が両レプリコンに対して競合するこ

とによって、問題の株の高温感受性が現われると推測された[61]。本研究においては、新たに、そのmini-F-pBR322 複合プラスミドが安定DNA複製に対する阻害効果をもたらすことを明らかにした。しかしながら、mini-F 複製との関係を調べるため、このプラスミド上の阻害因子を詳細に解析すると、前の報告とは異なって、mini-F の複製に関与する領域は問題の株の高温感受性の誘起に不要であった。そして、mini-F 断片の*sopA* プロモーターが*bla* (β -ラクタマーゼ) 遺伝子上流に同遺伝子と順方向で存在することが必要であることが判明した。他プロモーターに交換しても同様な安定DNA複製の阻害が確認されたことから、 β -ラクタマーゼの過剰発現が安定DNA複製の開始を阻害すると考えられる。

第 1 章

DnaA 蛋白質の過剰供給と蛋白質合成に 依存しない、染色体複製の過剰開始

結果

第 1 節 GroE 蛋白質過剰供給によって起こる、*dnaA46* 変異株の低温感受性は優性形質である

高温感受性の *dnaA46* 変異株は、GroE 蛋白質（GroEL 蛋白質と GroES 蛋白質）の過剰供給によって 42°C で成育可能となる。このとき、同時に低温感受性が表われる [18、36]。この低温感受性の原因には少なくとも次の 2 種が考えられる。第 1 には、染色体の過剰複製または開始ポテンシャルの過剰蓄積が起こり、これが細胞増殖を阻害する結果となることである（開始ポテンシャルとは蛋白質合成がない状態での複製開始能を言う）。実際に、*dnaA46*(Cos) と呼ばれる、*dnaA46* の遺伝子内抑制変異を持つ株では低温で染色体の過剰複製を伴って細胞増殖が阻害される。第 2 には、変異 DnaA 蛋白質と GroE 蛋白質とが、複製開始を不可能とするような複合体を形成してしまうことである。

そこで、これらの可能性を判別するためにまず、低温感受性に対する *dnaA*⁺ による相補性を検討した。上に述べた第 2 の可能性が実現している場合には、低温感受性が相補されることが期待される。ここでは、GroE 蛋白質の過剰供給のため、pBR322 上に *groE* オペロンをクローンしたプラスミド、pGroE を用いた（図 6）。pGroE による形質転換のため、*dnaA46* 変異株 KA413 の高温感受性は抑制され、同時に、低温感受性が現われた（図 7）。この低温感受性は、最小培地におい

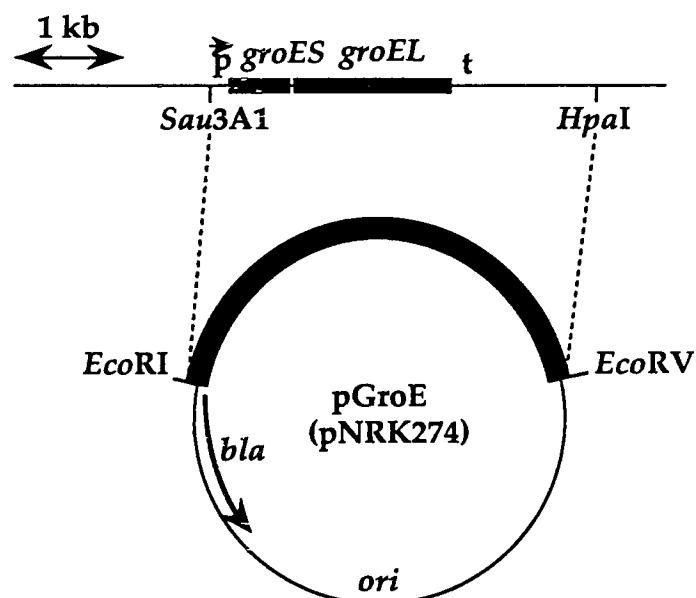


図 6 pGroEの構造

pGroEはプロモーター(\vec{p})、およびターミネーター(t)を含む *groE* オペロン全体をpBR322上に持つ。プラスミド上流の *Sau3A1* 部位は *EcoRI* リンカーに置き換えられた後、pBR322 に連結された。

では、ほとんど完全にコロニー形成が阻害されるほど著しく現われる(表3)。

相補性試験を行なうため、 $\lambda imm^{21} dnaA^+$ を溶原化させた *dnaA46* 変異株KA413Aを宿主に用いた。このファージの溶原化により *dnaA46* 変異による高温感受性は相補され、pBR322 によるKA413Aの形質転換体は高温でも低温でも同様に生じる。一方、pGroE の形質転換によって現われる低温感受性はKA413A においても失われないことがわかった(図7、表3)。

さらに、同じファージを溶原化させた *dnaA* 遺伝子野生株KH5402-1A は、pGroE により形質転換されても、低温感受性を示さない(図7)。このことは、先の低温感受性が、単に *dnaA* の遺伝子量効果とpGroE とによって生じているのではないことを示している。したがって、GroE 蛋白質の過剰供給によって起こる、*dnaA46* 株の低温感

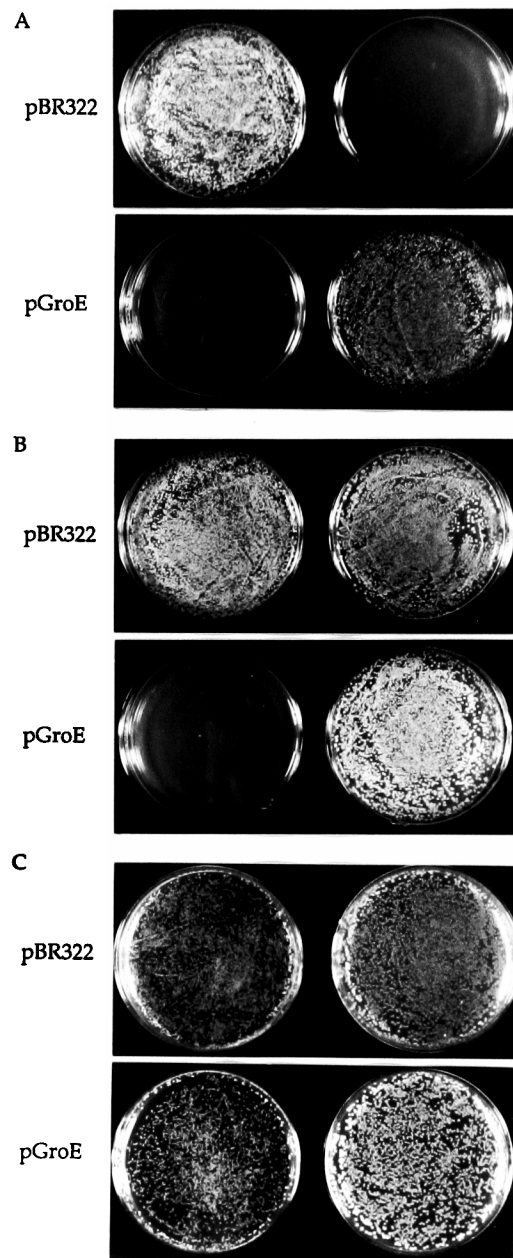


図7 KA413、KA413A、KH5402-1A に対する形質転換実験

等モルのpBR322、pGroE を用いて形質転換し、アンピシリンまたは、溶原菌に対してはアンピシリン+カナマイシンを含むL培地上にて20時間培養した。培養温度は、各パネルで左側が30°C、右側が42°C。A: KA413 (*dnaA46*)。B: KA413A (*dnaA46/λ imm²¹ dnaA⁺*)。C: KH5402-1A (*dnaA⁺/λ imm²¹ dnaA⁺*)。

表3 安定DNA複製は、pGroEを持つ *dnaA46* 株の低温感受性を解消できない

Strain	Relevant Genotype		Transformation Ratio (30°/42°C)	
	<i>supF6</i> (Ts) with		Plasmid	
	<i>dnaA</i>	<i>rnh</i>	pBR322	pGroE
KH5402-1	+	+	0.95	1.06
KA413	46	+	$>5.0 \times 10^3$ ($>1.2 \times 10^3$) ^a	2.3×10^{-3} ($<7.0 \times 10^{-4}$)
KA413A	46/+ ^b	+	1.00	1.4×10^{-3}
KA160	46	199 (Am)	1.30	7.3×10^{-4}
YT297	17 (Am)	199 (Am)	1.10	1.10
KA421	46	:: <i>cat</i>	1.80 (0.91)	1.5×10^{-3} ($<8.5 \times 10^{-4}$)
YT429	::Tn10	:: <i>cat</i>	NT ^c (1.0)	1.55^d (2.3)
YT411	+	:: <i>cat</i>	1.26	1.29

形質転換後、50μg/mlアンピシリンを含むL培地にて、各温度で24時間培養した。直径1mm以上のコロニーを計数し、比をとった。

^a 括弧内の数字は、25μg/mlアンピシリンを含む最小培地 (ME) にて2日間、培養したもの。

^b $\lambda imm^{21} dnaA^+$ による、溶原菌。

^c 未計測。

^d 42°Cでなく、40°Cで培養した。42°Cでは増殖が遅く多くのコロニーの直径が1mmを越さなかった。

受性は、*dnaA* 野生株の表現型に対して優性であることが明らかとなった。

第2節 *oriC* に依存しない染色体複製系の導入によって、pGroE による *dnaA46* 変異抑制株の低温感受性は失われれない

以上のように、ここで問題となっている低温感受性に関しては、*dnaA* に対して *dnaA46* が優性であることがわかった。そこで前節に述べた第1の可能性が適当であると思われる。しかし、さらに、この低温感受性が、第2の可能性、すなわち、複製開始欠損のよるものでないことを確かめるために、RNase H (*rnh* 遺伝子) 欠損による安定DNA複製による *oriC* 非依存性複製系が、問題の低温感受性を抑制して低温耐性としうるか否かを調べた。もし *oriC* での複製開始欠損によって低温感受性が生じているのなら安定DNA複製の活性化によって低温で増殖可能となるはずである。

形質転換実験の結果は、*rnh* 遺伝子欠損の導入によって、pGroEを形質転換した *dnaA46* 変異株の低温感受性は失われれないことを示した（表3）。KA421 [*dnaA46 rnh::cat*] 株は、42°C では安定DNA複製による、また、42°C では *oriC-dnaA* 系と安定DNA複製の両方による染色体複製が行なわれる。この株においても、pGroEの形質転換は、宿主の低温感受性をもたらした。YT427 [*dnaA::Tn10 rnh::cat*] はpGroEの形質転換によっても、30°C で増殖可能であるから、pGroEによって安定DNA複製が阻害されたのではない。しかも、YT297 [*dnaA17(Am) rnh-199(Am) supF6(Ts)*] はpGroEの導入によって低温感受性を示さない。これは低温感受性が *dnaA46* 特異的に起こることを裏付けている。

以上2つの実験から示されたように、pGroEを持つ *dnaA46* 株（以下、

dnaA46/pGroE 株と略記す) の低温感受性は、単純な複製開始欠損などのように、受動的原因によるものではなく、むしろ、細胞増殖に対する積極的な阻害機構の発現によるものと思われる。また、同時に、GroE 蛋白質とDnaA 蛋白質との相互作用が低温でも起こっていることが暗示される。

第3節 pGroE により抑制された *dnaA46* 株における、低温特異的な染色体の過剰複製

pGroEを持つ*dnaA46* 株において、染色体の過剰複製または開始ポテンシャルの過剰蓄積が起こっているか否か調べる目的で、低温移行後における、 $[^{14}\text{C}]$ チミンの酸不溶画分への取り込みを定量した。その結果、KA413[*dnaA46/pGroE*] 株においては、低温移行後に蛋白質合成に依存しない、染色体の過剰複製が起こることが明らかとなった(図8)。

42°C において対数増殖期にあるKA413[*dnaA46/pGroE*] 株およびKH5402-1[*dnaA⁺/pGroE*] 株を、30°C に移し、5分後にクロラムフェニコールを加えた。通常のコピー開始はクロラムフェニコール感受性であるので、この5分間に過剰のコピー開始が起こるか否かを調べようとした。クロラムフェニコール添加時を0時間とし30分ごとにサンプリングした。図8Aに示したように、KA413[*dnaA46/pGroE*] 株では低温において染色体の過剰複製が見られた。しかも、複製は、4時間にわたって続き、0時間の4倍量にも達した。これは、蛋白質合成非依存的に新しい複製開始が起こっていることを示唆する。このことは、クロラムフェニコール添加と同時に、あるいはクロラムフェニコール添加後に低温移行しても、過剰複製が起こった(図9)ことから裏付けられる。したがって、以上の実験結果は、この株での30°C における過剰の開始

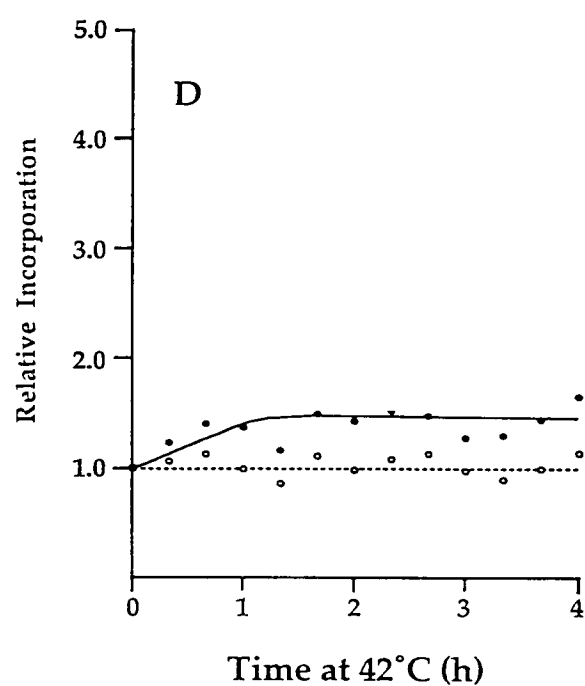
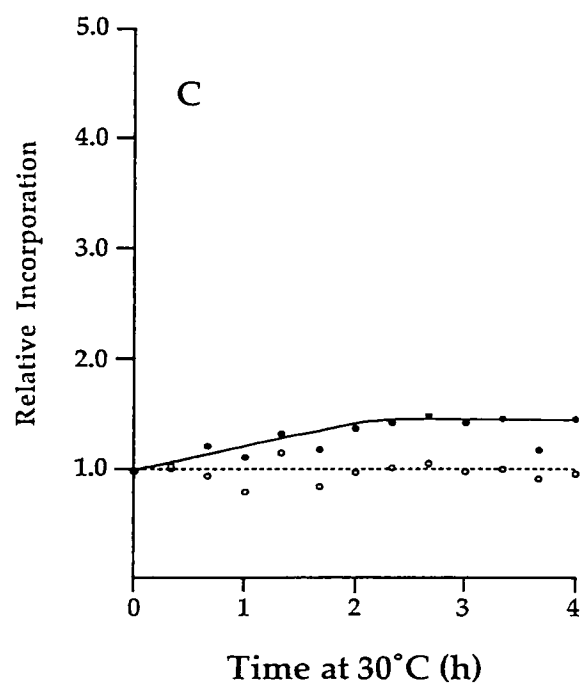
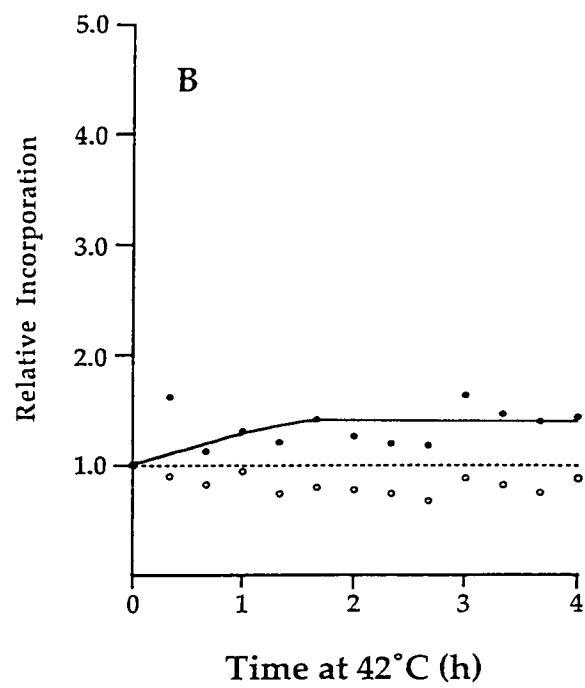
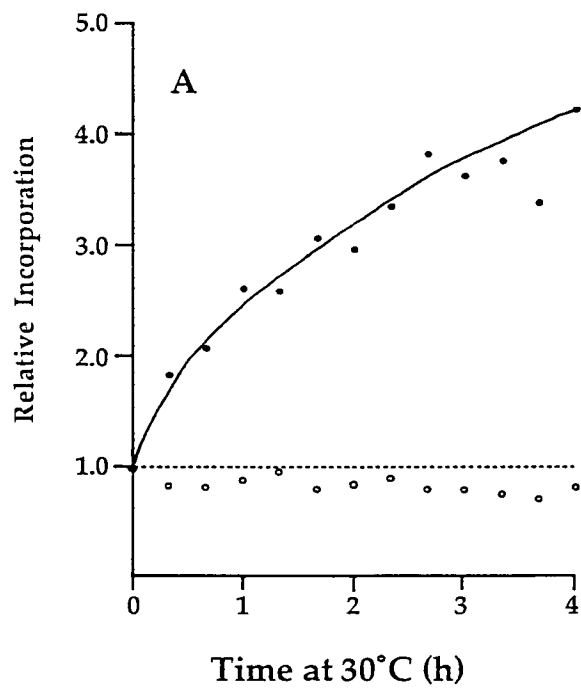


图 8

(続き)

図 8 染色体DNA合成

[^{14}C]チミン、[^3H]リジンを含む最小培地 (ME) で 42°C にて対数増殖期 (約 1×10^8 細胞/ml) にある培養液を2分した。一方は同温度に保持し、もう一方は 30°C に移行した。5分後、 $600\mu\text{g/ml}$ のクロラムフェニコールを加え、この時点を0時間とし、以後経時的にサンプリングして放射活性の取り込みを計測した。A および B KA413(*dnaA46/pGroE*)。C および D KH5402-1(*dnaA⁺/pGroE*)。A、C は 30°C へ移行したもの。B、D は 42°C に保持したもの。
● : [^{14}C]チミンの取り込み。○ [^3H]リジンの取り込み。

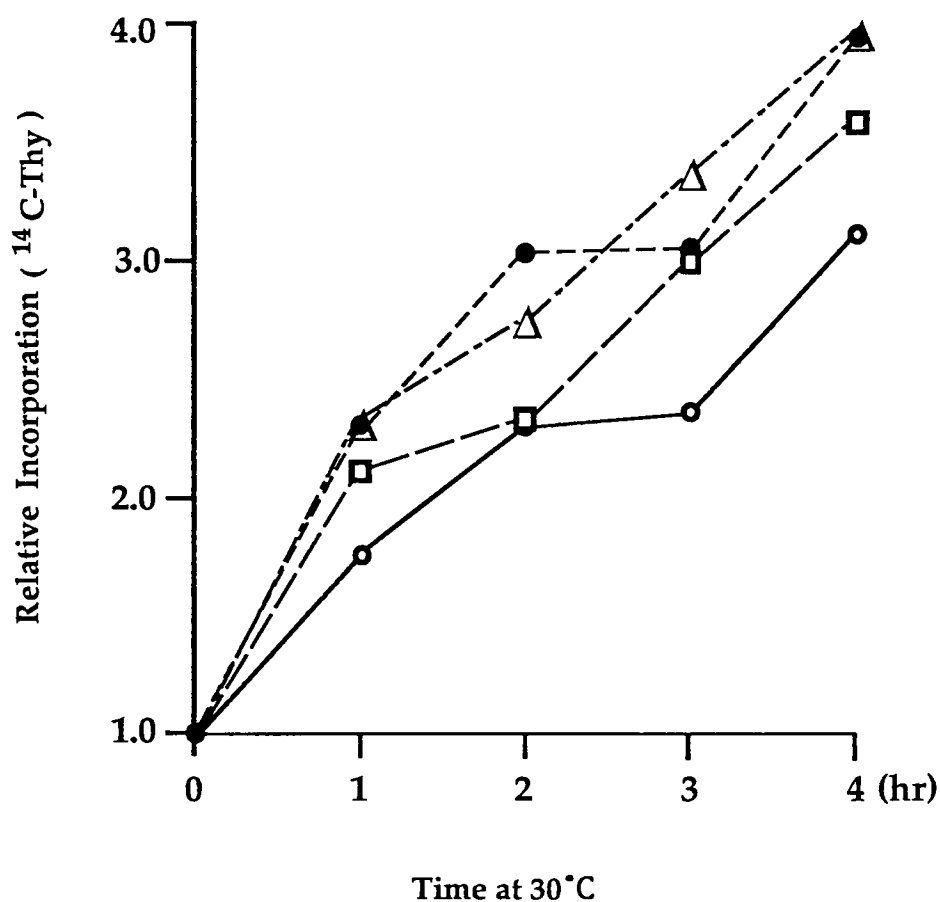


図9 高温でクロラムフェニコールを加えた場合の、染色体の過剰複製

[^{14}C]チミン、[^3H]リジンを含む最小培地 (ME) で 42°C にて、対数増殖期 (約 1×10^8 細胞/ml) にある KA413 (*dnaA46/pGroE*) の培養液にクロラムフェニコールを加えた。 42°C に適当な時間保持した後、 30°C へ移行し、この時点をも0時間とした。[^{14}C]チミンの取り込みのみを示している。薬剤添加後、温度移行までの時間は、それぞれ、0分 (記号○)、0.5分 (記号●)、5分 (記号△)、10分 (記号□)。なお、1分、3分の場合は、0.5分または5分の場合とほぼ同じであった (データ略)。

ポテンシャルを明らかにし、しかもそれが少なくとも2、3時間の間、保持されることを示唆している。

また、クロラムフェニコール以外の蛋白質合成阻害剤カナマイシン、ストレプトマイシンでも同じ過剰複製が見られた（データ略）。これは薬剤特異性を否定する。

一方、42°CではKA413[*dnaA46/pGroE*]株においても過剰複製は見られなかった（図8B）。取り込みの少量の増加は複製フォークの伸長に伴うものと思われる。これは、蓄積された開始ポテンシャルの発現には低温状態が必要であることを示している。また、KH5402-1[*dnaA⁺/pGroE*]株においては、高温でも低温でも通常の複製のみが起こった（図8C、D）。

また、以上の結果から、ここにおいて、KA413[*dnaA46/pGroE*]株の低温感受性は過剰な開始ポテンシャルの蓄積と相関関係があることが示唆された。

第4節 過剰複製の開始反応は転写反応に依存する

通常の複製開始の過程には、蛋白質合成に依存する段階の後に転写に依存する段階がある[52]。ここで見られた過剰複製にも同様に、開始過程に転写依存性が見いだされた（図10）。

42°Cで対数増殖期にあるKA413[*dnaA46/pGroE*]株にクロラムフェニコールを与え、3分後に30°Cへ移行し、この時点をも0時間とした。0時間および0.5時間後にリファンピシンを添加して同温度で保温し0.5時間ごとにサンプリングした。その結果、0時間にリファンピシンを加えた場合には、取り込みは少量の増加があったのちにほぼ完全に停止した。これは複製開始がリファンピシン感受性であったことを示唆す

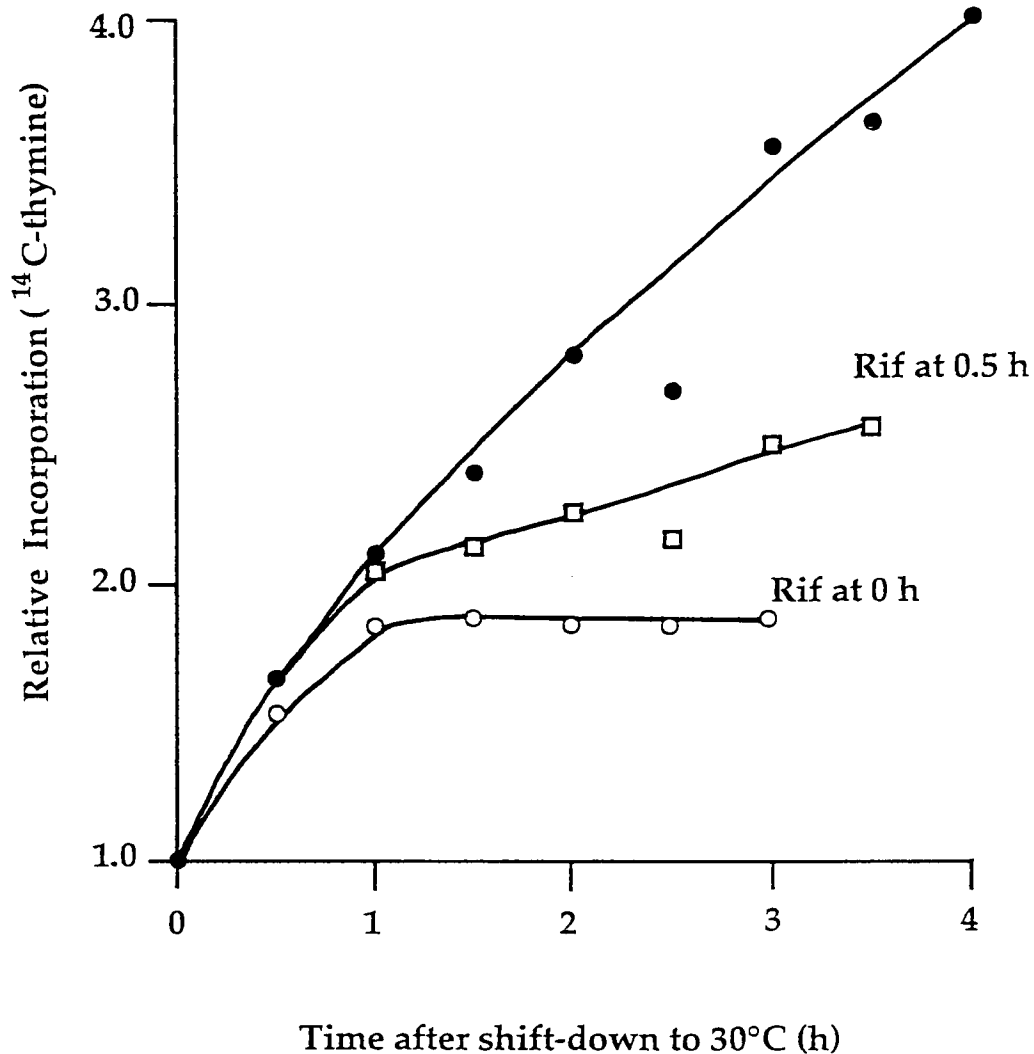


図 10 染色体過剰複製のリファンピシン感受性

[^{14}C]チミン、[^3H]リジンを含む最小培地 (ME) で 42°C にて、対数増殖期 (約 1×10^8 細胞/ml) にある KA413 (*dnaA46/pGroE*) の培養液にクロラムフェニコールを加えた。 42°C に3分間保持した後、 30°C へ移行し、この時点をも0時間とした。一部を、0時間 (記号○)、および、0.5時間 (記号□) において、 $100\mu\text{g/ml}$ リファンピシン処理に移した。記号●はリファンピシン無処理。 ^{14}C チミンの取り込みのみを示している。

る。また、0.5時間後にリファンピシンを加えた場合にも明らかに、取り込みの阻害が見られた。これは、蛋白質合成が伴わないにも拘わらず、30°Cにおいて連続的に複製が再開始していることを示唆している。ただし、0.5時間後にリファンピシンを加えた場合には複製は完全に停止せず、残存的な増加が続いた。これは、複製フォークの進行速度が低下しているため終結点への到達が遅延していることによるか、または、わずかにリファンピシン抵抗性の複製開始が起こっていることによるのかも知れない（考察参照）。

第5節 過剰複製は*oriC* 部位から起こっている

過剰複製の詳細な解析のために*oriC* と *terC* のDNAプローブを用いて過剰複製の過程における遺伝子量（DNA量）の変化を追跡した。もし、過剰複製が*oriC* から起こっているのなら、まず*oriC* の遺伝子量が増加し、その後に*terC* の遺伝子量が増加するはずであり、実際に、この予想のとおりであった（図11）。

oriC プローブは染色体上、84.0分に位置し、*terC* プローブは同30.9分に位置するものを用い、「材料と方法」に記述したようにしてそれぞれの遺伝子量の変化を追った。前節と同様にして、KH5402-1[*dnaA*⁺/pGroE] 株とKA413[*dnaA46*/pGroE] 株とを温度移行した。KA413[*dnaA46*/pGroE]では温度移行後、速やかに*oriC* 遺伝子量が増加し始めた。一方、*terC* 遺伝子量は始めは対照実験のKH5402-1[*dnaA*⁺/pGroE] 株とほぼ同様にゆっくりと増す。そして180分後に急激に上昇し始めた。これらの結果は、過剰複製の間、*oriC* で形成された新しい複製フォークが順次*terC* に向かって進行していることを強く示すものである。

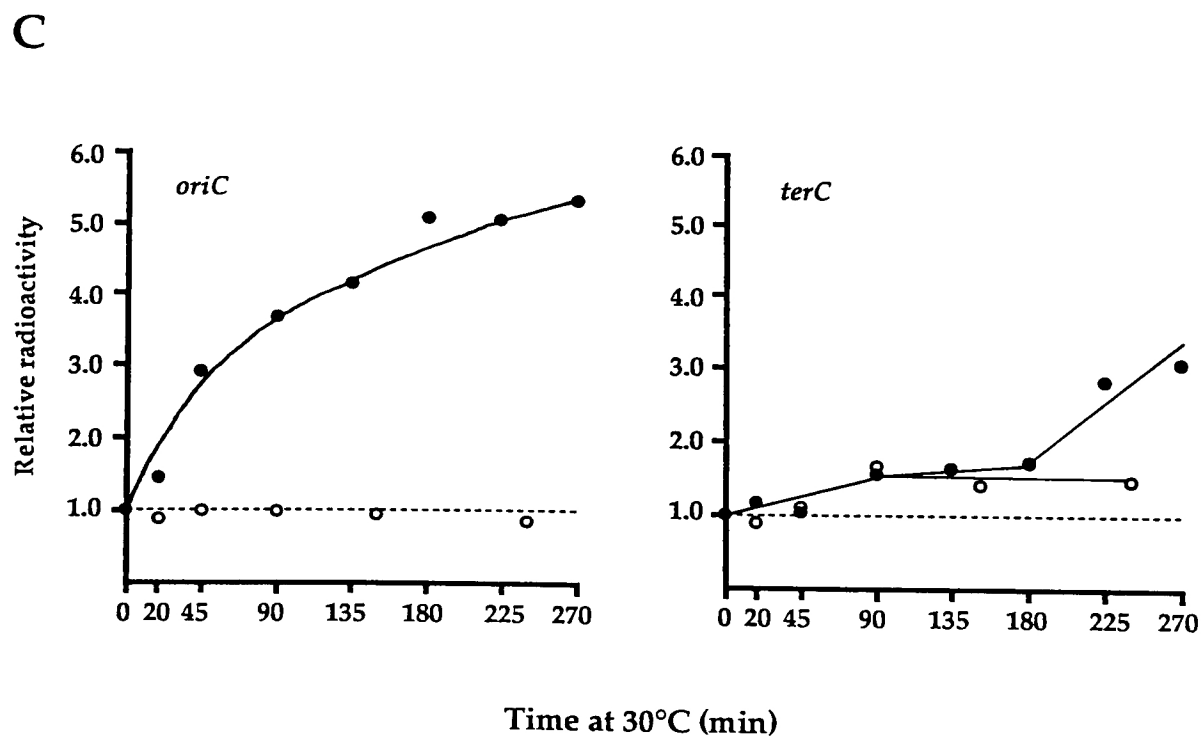
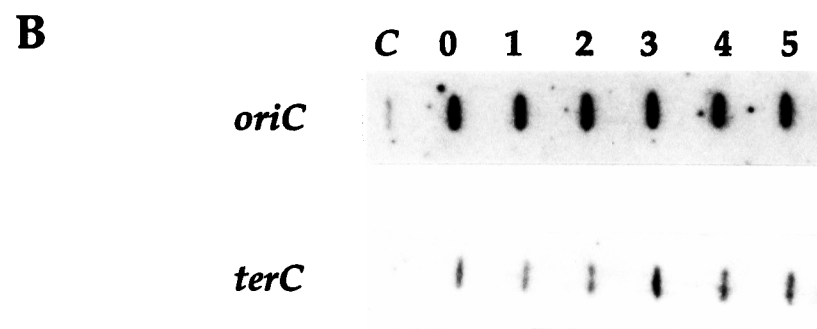
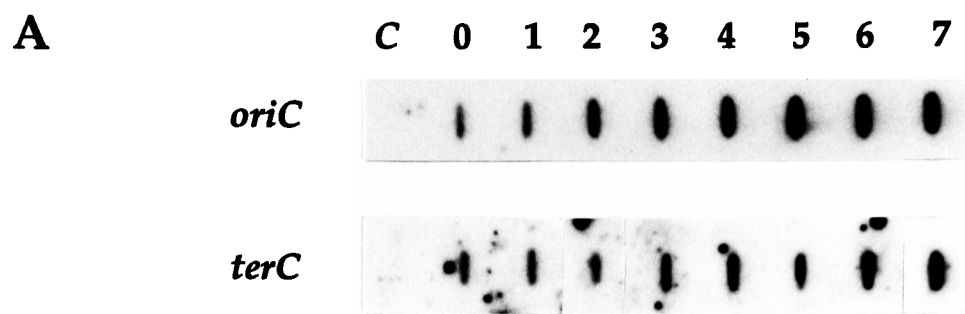


图 1 1

(続き)

図 11 *oriC* および *terC* の遺伝子量の時間変化

図 9 と同じ条件で培養液を低温移行した。遺伝子量の定量法は「材料と方法」に記述した。A: KA413 (*dnaA46/pGroE*)。数字 0、1、2、3、4、5、6、7 は、それぞれ、時間 0、20、45、135、180、225、270 (分) を指す。C はバックグラウンドコントロールとした YT429 ($\Delta oriC$)。B: KH5402-1 (*dnaA*⁺/pGroE)。数字 0、1、2、3、4、5 は、それぞれ、時間 0、20、45、90、150、240 (分) を指す。C はバックグラウンドコントロールとした PLK1434 ($\Delta terC$)。C: 各プロットの放射活性の時間変化。0 時間の放射活性を 1 として相対値を示す。●: KA413 (*dnaA46/pGroE*)。○: KH5402-1 (*dnaA*⁺/pGroE)。

KA413[*dnaA46/pGroE*] 株の *oriC* 遺伝子量は低温において4時間以上増え続けた (図 1 1 C)。これは、蛋白質合成を伴わない状態で新たな複製開始が起こっていることを直接的に示している。この結果は、図 8 および図 1 0 の結果と非常によく一致しており、また、ここで見られた *oriC* 遺伝子量から、蛋白質合成に依存しないで4時間の間に4回または5回の複製開始反応が *oriC* にて起こっていると思われる。

第6節 過剰開始はDnaA 蛋白質の量的増加によるものではない

DnaA 蛋白質の過剰供給によって染色体複製の過剰開始が起こることが知られている [2、66、81]。そこで、KA413[*dnaA46/pGroE*] 株の DnaA 蛋白質量をイムノプロット法で定量したところ、野生株に対してほぼ同量の DnaA 蛋白質しか持たないことが判明した (図 1 2)。

KH5402-1[*dnaA*⁺] 株、KH5402-1[*dnaA*⁺/*pGroE*] 株、および KA413[*dnaA46/pGroE*] 株の3株を42°Cで、KA413[*dnaA46*] 株を30°Cで培養し初期対数増殖相に至ったところで急冷し、「実験手法」に示したように濁度を均一化し溶菌処理した後、それぞれ同量を用いて SDS-PAGEを行なった。次にセミドライブロッティング法にてニトロセルロース紙に蛋白質を移行・吸着させ、アフィニティ精製された抗 DnaA 抗体、引き続き、発色用ペルオキシダーゼが結合した2次抗体にて処理した。結果は、図 1 2 に示すように、調べた4株で DnaA 蛋白質量はほとんど同じであり、KA413[*dnaA46/pGroE*] 株において DnaA 蛋白質の過剰供給は起こっていないことが明らかとなった。4回の独立の実験で現われた DnaA 蛋白質のバンドをデンシトメトリーにて測定した結果、KA413[*dnaA46/pGroE*] 株における DnaA 蛋白質量は KH5402-1[*dnaA*⁺] 株の平均1.1倍程度であった。

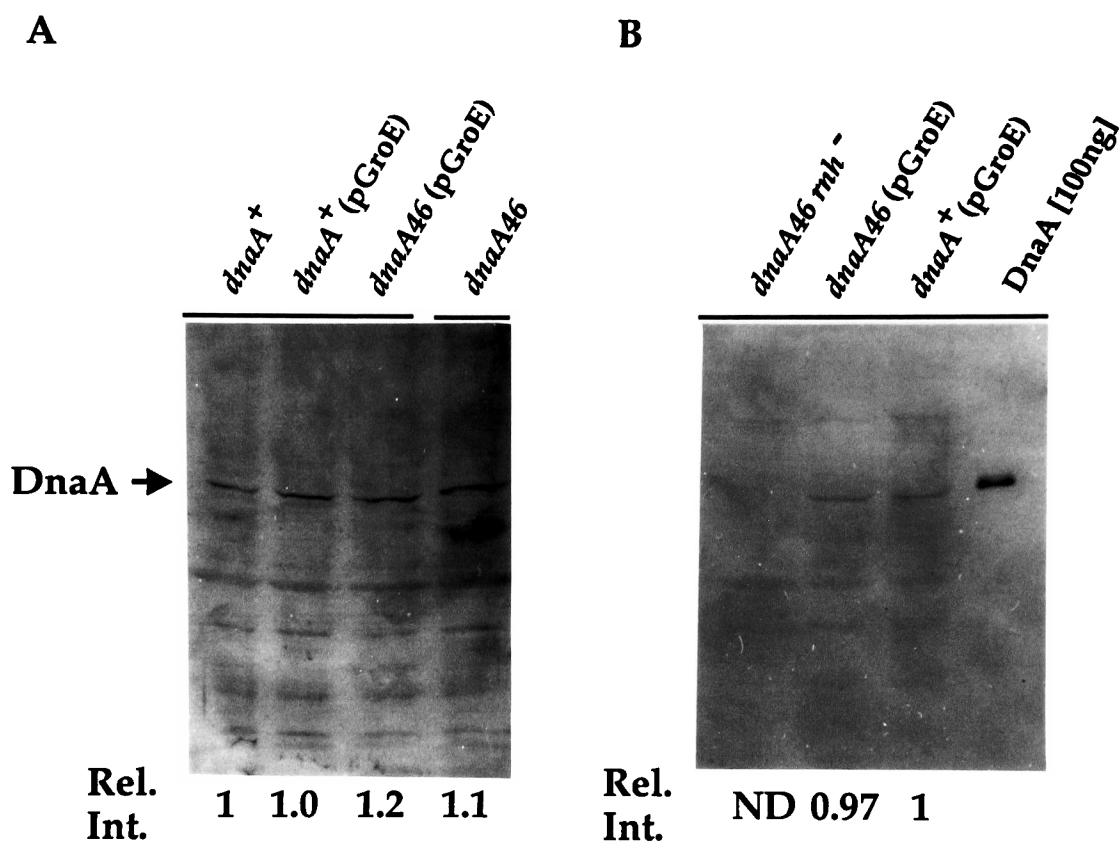


図 12 DnaA 蛋白質のイムノプロットティング

A. KH5402-1 (*dnaA*⁺)、KH5402-1 (*dnaA*⁺/pGroE)、KA413 (*dnaA46*/pGroE) の3株は42°Cで培養した。KA413 (*dnaA46*) は30°Cで培養した。

B KA160 (*dnaA46*, *rnh-199*, *supF6*)、KA413 (*dnaA46*/pGroE)、KH5402-1 (*dnaA*⁺/pGroE) の各株を42°Cで培養した。

ND バンドは検出されない。

Rel. Int. DnaA 蛋白質のバンド濃度を KH5402-1 (*dnaA*⁺/pGroE) の場合を1として相対値で示した。

次に、42°CでGroE蛋白質の過剰供給のない場合のDnaA46蛋白質量と比較するため、RNase H欠損のため抑制されている *dnaA46* 株のDnaA蛋白質量を同様に調べた。KA160[*dnaA46 rnh-199*(Am) *supF6*(Ts)] 株は高温でアンバーサプレッサーが失活するためRNase H欠損となり、その結果、安定DNA複製が活性化して高温での染色体複製と細胞増殖が可能となる。42°Cで初期対数増殖相にある、KA160株、KA413[*dnaA46/pGroE*] 株、KH5402-1[*dnaA*⁺/*pGroE*] 株の3株を用いて同様にDnaA蛋白質に対してイムノプロットを行なった結果、KA160株ではDnaA蛋白質のバンドが見えなかった（図12B）。これは、過剰のGroE蛋白質が供給されない場合、DnaA46蛋白質が高温においては不安定で、速やかに分解されていくことの帰結と思われる。

考察

第1節 pGroE の形質転換によって発現する、*dnaA46* 株の低温感受性

GroEを大量供給するpGroEの形質転換によって、*dnaA46* 株は高温耐性を獲得すると同時に低温感受性となる。本研究によって、この低温感受性は*dnaA46* 変異に依存し、かつ、同変異は低温感受性に関し*dnaA*⁺遺伝子に対して優性であることが判明した（図7、表3）。しかも、安定DNA複製、R100.1によるintegrative suppressionの導入はこの低温感受性を打消して低温耐性とすることができないことがわかった（表3、未発表）。以上の事実は、まず、低温感受性の生じる原因が、単純な複製開始欠損など、受動的なものでなく、むしろ、細胞増殖に対して積極的な阻害機作の発現であることを思わせる。次に、大量供給されたGroE蛋白質と変異DnaA蛋白質との相互作用が低温においても起こっていることを示唆している。

なお、Hansen らによると *dnaA46/dnaA*⁺ 部分二倍体は低温においてわずかに増殖阻害が現われるという[26]。しかし、本研究においてはそのような障害はほとんどなかった（図7B、C）。したがって、本研究では部分二倍体そのものによる影響は無視できる。

第2節 pGroEを持つ*dnaA46* 株で低温特異的に起こる、染色体の過剰複製

前節での推測は、pGroEを持つ*dnaA46* 株では、低温において染色体

の過剰複製が起こっているか、または、開始ポテンシャルの過剰蓄積が起こっていることを意味する。実際、高温で対数的に増殖している pGroE を持つ *dnaA46* 株において、低温移行後に蛋白質合成に依存しない、染色体複製が起こることがわかった（図 8、9）。これは、過剰の開始ポテンシャルの蓄積が起こっていたことを直接的に明らかにしたものである。また、これは低温での増殖阻害の原因が開始ポテンシャルの過剰蓄積であることを暗示する。

一方、pGroE を持つ *dnaA46* 株を蛋白質合成を阻害せずに、低温移行した場合、過剰複製は起こるものの、その程度は、蛋白質合成を阻害した場合の2分の1ほどであった。すなわち、高温で対数増殖している同株を、低温移行すると、一旦DNA合成が止まり、移行時より約30分後に1.8倍に急増して、定常状態に達した（未発表）。通常は複製開始に必須である蛋白質合成が、過剰開始のためにはむしろ阻害的に働くのである。

同様な観察が、*dnaA* 変異株を中間温度で培養した場合にも見られている（後出）。Lycett らは、蛋白質合成阻害直後にRNA合成が一時的に上昇することが、過剰開始の契機として必須であると考えている [54]。また、最近、DnaA 蛋白質の過剰供給による過剰開始の場合にも同様な現象が観察された。すなわち、過剰開始が起こっても、*oriC* 近傍で複製フォークが止まってしまい (abortive initiation)、その結果、染色体DNAの全体量はほとんど増加しないことがわかった [2]。停止した複製フォークはクロラムフェニコールまたはリファンピシンの処理によって再進行する [53、66、73]。現在、この abortive initiation のメカニズムは全くの謎である。しかし、蛋白質合成中にはDNA量/蛋白質量という、全体的な恒常性の維持のために、複製フォークの伸長に対しても何らかの積極的な制御機構が働いている可能性もあり、興味深い

ものである。

第3節 過剰複製の転写依存性

通常の *oriC* での複製開始は転写に依存する [52]。pGroEを持つ *dnaA46* 株の過剰複製もリファンピシンに感受性であることから転写に依存することがわかった (図 10)。しかも明らかに、いわゆる、'slow stop' 型であるため、開始反応が阻害されていると考えられる。また、低温移行後0.5時間にリファンピシンを添加した場合にも、過剰複製は阻害された。これは、開始反応が、一過性の爆発的反應として起こるのでなく、暫時繰り返していることを示唆している。

ところで、0.5時間後でのリファンピシンを添加の場合、 $[^{14}\text{C}]$ チミンの取り込みは、その後2.5時間にわたり、止まらずに緩やかな増加を示した。これは、過剰複製の過程で、わずかにリファンピシン抵抗性の複製開始が起こっていることのためかも知れない。あるいは、複製フォークの進行が減速していて、終結点への到達が遅延しているためかも知れない。少なくとも、DnaA 蛋白質過剰供給による過剰開始の場合には、緩慢な複製フォーク進行が観察されている [53、73]。また、この可能性を支持する結果が他の実験からも得られた (後出)。

第4節 過剰開始の様式

oriC プローブ、*terC* プローブを用いた遺伝子量測定実験から、過剰開始は *oriC* から起こっていることが裏付けられた (図 11)。

また、この実験において、*oriC* の相対量は4時間以上にわたって、増加し続け、0時間の5倍量を越した。これは、この間に開始反応が繰り返

返し、4から5回、起こったことを示すと思われる。このことから、DnaA 蛋白質が長時間にわたって活性化された状態に保たれていたことが推測される。

一方、*terC* プローブの増加様式は、過剰開始を起こしている株では複製フォークの進行速度が遅れていることを示唆する結果が得られた。すなわち、*oriC* での過剰開始に由来すると思われる *terC* の遺伝子量の急増が温度移行から180分後になって、やっと、現われるのである。

ここで用いた、*terC* プローブは安定DNA複製の複製起点が存在すると思われる部位に相当している[15]。*terC* 遺伝子量は、*oriC* 遺伝子量の後になって急増してくることから、過剰複製は安定DNA複製によるものではないと思われる。さらに、*dnaA46 recA1* 二重変異株でも pGroEによって、高温感受性の抑制と低温感受性の発現が見られた(データ省略)。これはこの2つの現象の原因が安定DNA複製の発現ではないことを示す。

第5節 過剰開始はDnaA 蛋白質量の過剰供給を伴っていない

過剰開始はDnaA 蛋白質の過剰供給によるものではないことが明らかとなった。過剰複製の起こる株でも、起こらない株と比べて有意に多量のDnaA 蛋白質を持っていなかった(図12)。この事実は、今まで観察されたことのないものである。

DnaA 蛋白質の過剰供給のない状態で、いかにして過剰開始が起こるのであろうか。その仮説的な機構に関しては後に述べることとする。ただし、DnaA 蛋白質の活性化状態が保たれることによって、繰り返し開始が起こることが過剰開始の一原因であることは確かと思われる。ここでは、cAMP がDnaA 蛋白質の活性化に *in vivo* においても関与し

ている可能性を指摘しておきたい。

「序論」でも述べたように、*in vitro* の複製系においてはcAMP は DnaA 蛋白質のADP（不活性）型からATP（活性）型への変換を促進する[33]。予備的実験の結果ではあるが、*dnaA46 cya* 二重変異株においては、pGroEによって、高温耐性の獲得は起こるが、低温感受性の発現はやや弱くなる。しかも、低温移行後に起こる、蛋白質合成非依存性の、過剰複製も*dnaA46 cya*⁺株の2分の1程度にしか起こらなかった。また、低温移行時に5mM cAMP を培地に加えると、過剰複製は部分的に回復して、2者の中間の程度で見られた（未発表）。この事実は、少なくとも、過剰複製に関しては、cAMPがDnaA 蛋白質の活性化またはその状態の維持に関与している可能性を暗示している。

第6節 *dnaA46*(Cos) 変異による過剰開始との比較

dnaA46(Cos) 変異は*dnaA46* 変異の遺伝子内抑制変異として分離されたが、その表現型として高温耐性と低温感受性とを同時に示す。しかも、低温移行によって染色体の過剰複製が起こる[39]。ただし、過剰複製の様式からこの株で見られる過剰開始は一過性で短時間にまとまって起こっていると思われる。

さらに、この株では蓄積された開始ポテンシャルは不安定で急速に失われる。つまり高温でクロラムフェニコールを添加後、10分後に低温移行すると、最適条件（薬剤添加時）で移行した場合の60%程度の過剰複製しか起こらない。一方、pGroEを持つ*dnaA46*株では、同じ実験で、10分後に移行しても約90%の(図8)、30分後でも約80%の（データ略）過剰複製が起こり、開始ポテンシャルが安定に長時間保たれている。

この2点から *dnaA46*(Cos) 変異株においては本研究で観察した過剰開始とは異なった機構で過剰複製が起こっていると推測できる。*dnaA46*(Cos) 変異株中のDnaA 蛋白質量に関しては現在知られていない。

第7節 過去に観察された、高温感受性*dnaA* 変異による過剰開始

dnaA46 変異に関しては、変異株を中間温度 (35°C) で培養すると、過剰の開始ポテンシャルが蓄積することが知られている[28]。また、制限温度に数十分おいて、低温に温度移行したときにも過剰複製が起こり、開始ポテンシャルが蓄積していたことがわかった[75]。他の高温感受性*dnaA* 変異でも同様な観察がされた[31、68]。

この過剰複製が起こる機構として、現在までもっとも有力な仮説は、中間温度または制限温度での培養によってDnaA 蛋白質が部分的に変性しDnaA 蛋白質のオートリプレッサー活性が欠損することによってDnaA 蛋白質の過剰供給が起こっているとするものであった。実際、*dnaA46* 株においては42°C で*dnaA* 遺伝子の過剰の転写が起こっていた[1、11、48]。

しかしながら、DnaA 蛋白質の蓄積は実際に観察されていない。しかも、本研究でも示唆されたように (図 1 2 B)、変異DnaA 蛋白質の分解は非常に速いと思われる[68]。したがって、先の仮説が、現実になり立っているかどうかは大変疑わしいと考えられる。後に述べるように、本研究では、部分的な変性状態にあるDnaA 蛋白質が高い開始活性を持つという仮説を提出する。この仮説に従えば、ここで述べた過剰開始に対する説明は極く単純かつ容易である。

第8節 GroE 蛋白質の機能から見た、変異DnaA 蛋白質の複製開始

に対する挙動

groE 遺伝子 (GroE 蛋白質) は数種のファージの形態形成に必要な宿主因子として発見された[20]が、宿主の増殖にも必須である[19]。また、主要熱ショック蛋白質として菌の耐熱のため中心的な機能を持つ[49]。GroE 蛋白質は、14-merのGroEL 蛋白質 (MW. 57kD) および6-から8-mer のGroES 蛋白質 (MW. 10kD) との複合体から形成される[29]。GroEL 蛋白質の類似蛋白質は汎生物的に存在し、多くの真核細胞の葉緑体、ミトコンドリアから見いだされている[29、58]。GroE 蛋白質は、その特異な機能面から、PCB (Polypeptide Chain Binding) 蛋白質、または、分子シャペロンと呼ばれることもある[17、67]。これは他の蛋白質の折りたたみ (folding) 構造を認識し積極的に折りたたみの制御に関わる酵素の総称である。分子シャペロンの働きによって、蛋白質の局在化、分子集合、変異蛋白質の機能回復などが起こりうる。

GroE 蛋白質は折りたたみの不完全な新生蛋白質と相互作用する[7、51]。pre- β -lactamase はGroE 蛋白質との相互作用によって、折りたたみ弛緩 (unfolded) 状態に保たれ、その結果、膜透過が可能となる。また、Rubisco (リブローズ二リン酸カルボキシ化酵素) large subunit の分子集合の場合も同様に、GroE 蛋白質との相互作用によって折りたたみ弛緩の状態に維持される過程が必須である[23、24]。また、遺伝学的に、GroE 蛋白質の過剰供給はミスセンス変異による多くの高温感受性蛋白質の機能を回復させることが示されている[78]。

GroE 蛋白質過剰供給による *dnaA46* 株の高温耐性の獲得も、同様に GroE 蛋白質によって変異DnaA 蛋白質の折りたたみが補正されることによるものと思われる。このときの補正過程にはDnaA 蛋白質の折りたたみ弛緩状態に保たれる過程が含まれていると類推される。

低温での過剰開始を説明するために、ここで一つの仮説を設けたい。それは、「DnaA 蛋白質は部分的な折りたたみ弛緩の状態にあるとき、複製開始活性をもつ」というものである。

dnaA46 株が低温にあるときは、DnaA46 蛋白質の構造は野生型に近似しているはずである。このような場合に、DnaA46 蛋白質がGroE 蛋白質と相互作用することは、折りたたみの弛緩状態を安定化させ、このため、*oriC* での複製開始が過剰に起こると考えることが可能である（図 1 3 A）。

この仮定的なDnaA 蛋白質の活性制御は野生型DnaA 蛋白質に対しても演繹できるかも知れない。つまり、翻訳直後のDnaA 蛋白質は短時間折りたたみの弛緩した状態にあり、このときのみ、DnaA 蛋白質は複製開始活性を持つと考えることが可能である（図 1 3 B）。通常は*oriC* の複製開始は蛋白質合成依存性である。ところが、pGroEを持つ*dnaA46* 株では低温において蛋白質合成に依存しない複製開始が起こっているらしいことは上の仮説を支持するものである。このような開始頻度の調節は蛋白質合成との共役に決定的な機能を果たし、さらに、増殖速度（蛋白質合成速度）と開始頻度との調和に寄与しているのかも知れない。

少なくとも、本研究によって、*in vivo* における複製開始頻度の調節はDnaA 蛋白質量に依存するものだけではないことが示された。今後は、DnaA 蛋白質のどのような状態変化が開始制御にとってもっとも重要なのかを*in vivo*、*in vitro* の両面から詳細に明らかにしていく必要がある。

A 変異DnaA 蛋白質

部分変性しているDnaA 蛋白質

↓
大量供給されたGroE 蛋白質との相互作用により、折りたたみ構造の弛緩状態に保たれる

↓
複製開始活性を持つ状態に維持される

B 野生型DnaA 蛋白質

翻訳直後のDnaA 蛋白質

↓
短時間、折りたたみ構造の弛緩状態にある

↓
複製開始に対する活性型

↓
安定な高次構造に移行する

↓
複製開始に対する不活性型

図13 DnaA 蛋白質の開始活性制御に関する作業仮説

第2章

β-ラクタマーゼの大量供給は安定DNA複製を 阻害する

結果

第1節 mini-F-pBR322 複合プラスミド pZK58 は、高温での *dnaA* *rnh* 二重欠損株の増殖を阻害する

pBR322 は、KH5402-1、KA152[*rnh*-199(Am) *supF*6(Ts)]、YT297 [*dnaA*17(Am) *rnh*-199(Am) *supF*6(Ts)] の3株において正常に保持される。ところが mini-F-pBR322 複合プラスミド pZK58 (図14) によって、この3株のうちYT297 だけが高温感受性となることがわかった(表4)。30°C で増殖させたそれぞれの形質転換体の、42°C におけるコロニー形成能を調べた。すると、pZK58をもつYT297だけが、明らかに高温感受性を示した。しかも、非選択培地においても同じであるため、プラスミドの安定保持が阻害されているのではなく、宿主の増殖が阻害されているものと思われる。

高温感受性のアンバーサプレッサーの失活のため、KA152、YT297 の2株においては42°C でRNase H が産生されなくなり、安定DNA複製が活性化する。L 培地においてはKA152も弱い高温感受性を示したが、最小培地 (M9) ではほぼ正常に増殖するため、これは、RNase H欠損株に現われるRms (rich medium sensitivity) 表現型[43]の部分的な発現と思われる。特に、YT297 においては42°C でアンバーサプレッサーの失活により *dnaA* の発現も阻害されるため、高温での染色体複製は安定DNA複製に依存している。そこで、pZK58 は安定DNA複製を阻害する

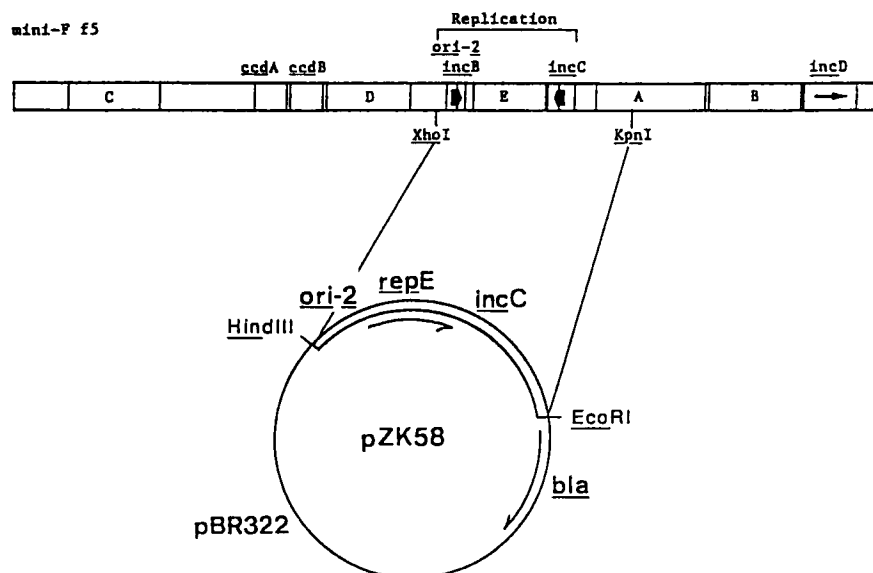


図 1 4 mini-F-pBR322 複合プラスミド pZK58

上図は mini-F f5 断片を示している。四角で囲まれたA、B、C、D、E はコードされている蛋白質を示す。特に、A は SopA、B は SopB、E は RepE 蛋白質。2.2kb の mini-F 由来断片の両端は pUC18 のマルチクローニング部位に連結されており、HindIII、EcoRI 部位でpBR322 とつながれている。

表 4 pBR322 またはpZK58 による形質転換体の増殖

Strain	Relevant genotype		Origin usage		Colony formation (42°/30°C)			
					Plasmid			
	<i>supF</i> (Ts) with		at 42°C ^a		pBR322		pZK58	
	<i>dnaA</i>	<i>rnh</i>	<i>oriC</i>	<i>oriK</i>	+Amp	-Amp	+Amp	-Amp
KH5402-1	+	+	+	-	0.95	NT ^b	0.40	0.43
KA152	+	199 (Am)	+	+	1.1	NT	0.068 (0.79) ^c	0.13 (0.55) ^c
YT297	17 (Am)	199 (Am)	-	+	0.43	0.20	5.0x10 ⁻⁴	4.3x10 ⁻⁴
KA160	46	199 (Am)	-	+	0.37	0.40	8.8x10 ⁻⁴	8.2x10 ⁻⁴
KA237	5	:: <i>cat</i>	-	+	0.75	0.74	9.8x10 ⁻³	2.9x10 ⁻⁵

30°C で得られた形質転換体をアンピシリンを含むL培地で同温度にて一晚培養した。この培養液を適当に希釈して、寒天培地に移し、30°C, 42°C に分けて培養した。

a: + は活性化している、 - は不活性の複製系。

b: NT、未計測。

c: 最小培地 (M9) 上での増殖。

ことによってYT297に増殖阻害をもたらしていることが考えられる。また、調べたかぎり、*dnaA* 変異と *rnh* 変異のアレル特異性はない。ここで、ミスセンス *dnaA* 変異株 (KA160、KA237) でもアンバー変異株 (YT297) と同じ結果となったことは、*dnaA* オペロンにおける極性効果の影響は無視できることを示している。

第2節 pZK58 は *rnh* 欠損株の安定DNA複製を阻害する

pBR322 を持つ KA152[*rnh*-199(Am) *supF6*(Ts)] 株は、42°C において、蛋白質合成阻害下でもDNA合成は続く、いわゆる、安定DNA複製が起こる。一方、第1節で予想されたように、pZK58 の導入によって同株の42°Cにおける安定DNA複製が阻害されることが明らかになった (図15)。[¹⁴C]チミン、[³H]リジンを含む最小培地 (M9) にて42°C で初期対数増殖期にある、KH5402-1/pBR322、KA152/pBR322、KA152/pZK58 の3株をクロラムフェニコール処理した。この時点を0時間とし、1時間ごとにサンプリングして酸不溶画分への放射活性の取り込みを調べた。このとき、[³H]リジンの取り込みから蛋白質合成が停止していることを確かめた (データ略 以下の同様な実験についても同じ)。そして、0時間の [¹⁴C]チミンの取り込み量を1として相対値を示した (図15)。KA152/pBR322 株では明らかに安定DNA複製が起こったが、KA152/pZK58 株では対照のKH5402-1/pBR322 株と同様、薬剤添加後約2時間でDNA合成が停止し安定DNA複製は起こらなかった。

第3節 mini-F 断片上における、YT297 株に対する増殖阻害因子

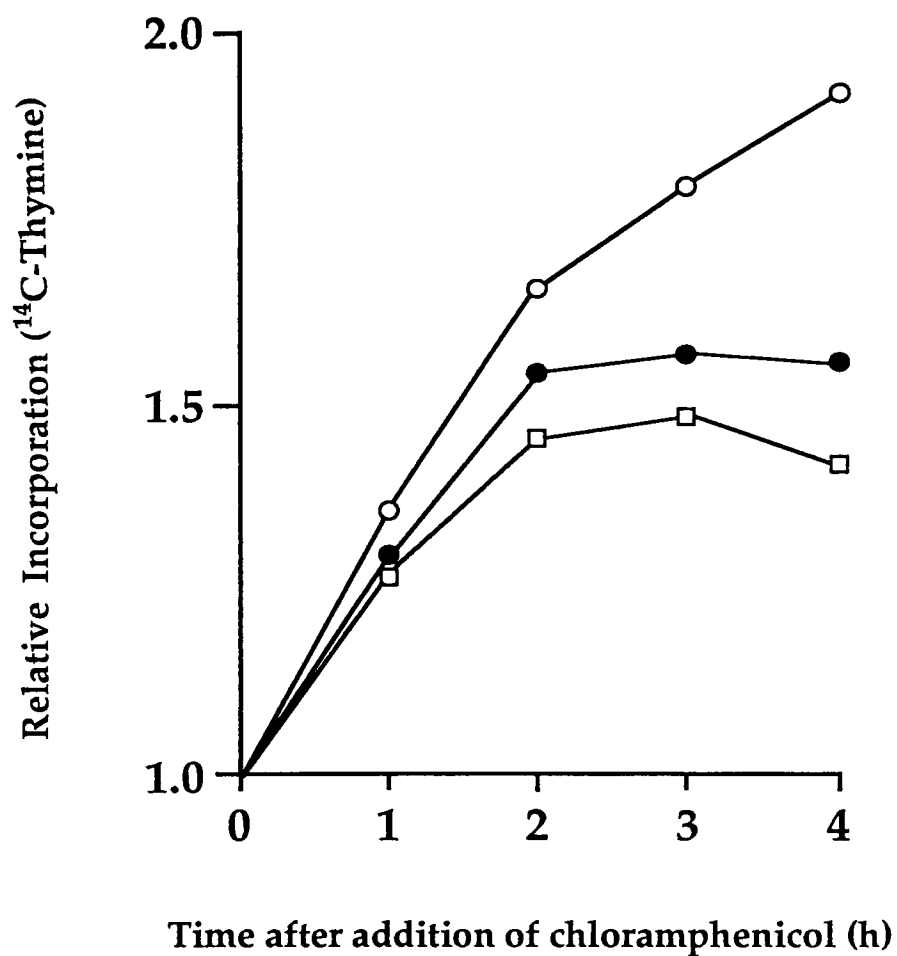


図15 クロラムフェニコール添加後のDNA合成

42°Cで増殖中の各形質転換菌の培養液にクロラムフェニコールを加えた。この時を0時間とした。実験方法は「材料と方法」に詳細に記した。●、KH5402-1 (pZK58)。○、KA152 (pBR322)。□、KA152 (pZK58)。

前節で判明した事実は、YT297 株の増殖阻害と安定DNA複製の阻害との間に対応関係のあることを示している。そこで、mini-F 断片上に存在すると思われる、安定DNA複製に対する阻害因子の同定のため、pZK58 のmini-F 領域の欠失変異体を作成してYT297 株に対する高温致死性を調べた。その結果、高温致死の決定領域は*sopA* プロモーターを含む約90bpの断片に限定された(図 1 6、1 7)。まず、最初に予想した mini-F-pBR322 の複製およびその制御に関わる領域、*ori-2* (AT-rich region、*incB*)、*repE*、*incC* の欠失を、それぞれ単独に、あるいは同時に導入しても、42°Cでの増殖阻害効果は失われなかった(図 1 6 : pZK350、300、278D、349、342、351)。一方、*incC* 下流領域の欠失によって、阻害効果は全く失われ(pZK319)、逆に、この領域のみで、pZK58 と同程度の高温致死性が現われた(pZK351)。さらに新たな欠失変異体によって、増殖阻害に必要な領域は*sopA* プロモーターを含む約90bp に限定できることがわかった(pZK305、360、362、359)。しかも、高温致死性の誘起に十分であった*sopA* プロモーターを含む約250bp の断片を逆向きに挿入すると、阻害効果はおよそ100分の1に減少した(pZK359R)。この事実は、このDNA断片の単独作用によって高温致死性が引き起こされることよりも、*sopA* プロモーターからの発現産物が高温致死の引き金となっている可能性を示している。

第 4 節 pBR322 上における、YT297 株に対する増殖阻害因子

pBR322 のみではYT297 株に対してなんの致死性ももたらされない。しかし、前節の結果は、*sopA* プロモーターからのpBR322 領域内への転写流入が重要な影響を持つことを示唆するものであった。そこで、pBR322 領域の欠失変異を分離、解析すると、予想どおり、pBR322 内

		Colony formation (42/ 30°C)	
		YT297	
		+Amp	-Amp
pZK58		5.0×10^{-4}	4.3×10^{-4}
pZK350		8.1×10^{-4}	NT
pZK300		1.2×10^{-3}	5.6×10^{-3}
pZK278D		2.5×10^{-3}	4.0×10^{-2}
pZK349		2.0×10^{-4}	8.4×10^{-4}
pZK342		1.7×10^{-4}	1.7×10^{-3}
pZK319		0.20	0.64
pZK351		9.4×10^{-5}	2.1×10^{-4}
pZK305		0.06	0.18
pZK360		3.8×10^{-4}	5.1×10^{-4}
pZK362		0.48	0.78
pZK359		2.1×10^{-4}	2.0×10^{-4}
pZK359R		0.036	0.040

図 1 6 pZK58 およびその欠失変異プラスミドによる YT297 株の高温致死性

mini-F の *ori-2* は AT (AT-rich region) と *incB* とに分けて示した。
sopAp は森[60]によって予想された、*sopA* プロモーターを指す。YT297 株の高温致死性は表 3 と同様にして調べた。

6401
 |
 AAA CA ACTT GCGG TTTT TTGA TGACTTTGCG ATTTT GTT G

 TTGCTT TGCA GTAA ATT GCAA GATT TAATAAAAAA ACG C
 -35 -10
 AAAGCAA
 |
 6487

図 1 7 mini-F 断片上の、最小領域の塩基配列

EMBL Data Base に従って、mini-F f 5 断片の 5' 末端の *EcoRI* 部位を 1 として塩基の位置を示した。*sopA* プロモーターの -35 領域、および、-10 領域を四角で囲って示した。また、この領域には、*sopA* のコーディングリージョンは含まれない [60]。

にも高温致死の決定因子が存在することが明らかとなった（図 18）。まず、*tet* 耐性遺伝子の全欠失および *rom/rop* 遺伝子の部分欠失は、元のプラスミドの致死性に変化を与えなかった (pZK332D)。また、pBR322 の *ori* 領域の方向逆転も致死性に影響ない (pZK332DR)。この結果は、mini-F 断片から pBR322 部分の *ori* 領域への転写流入は重要でないことを示す。

bla (β -ラクタマーゼ) 遺伝子領域を解析するため、mini-F 断片と pBR322 をつなぎ換え、pZK58 にテトラサイクリン耐性を持たせた (pZK343)。このとき、mini-F 領域を逆方向に連結すると、YT297 に対する致死性が減少したが (pZK343R)、これは前節最後に記述した結果と整合性を示している。

bla の全欠失によって、mini-F 断片の逆方向連結の場合と同様な程度に致死性が減少した (pZK346)。しかも、*bla* の全欠失と mini-F 断片の逆向き連結とを共存させても、さらに高温耐性が増すような加算的効果はなかった (pZK346R)。これは、両操作が同一の結果に帰結していることを暗示する。すなわち、*bla* の過剰発現の阻害、である。したがって、*bla* の過剰発現が YT297 株の増殖阻害の主原因と考えられる。これは、前節および本節において、*sopA* プロモーターが *bla* の上流で、*bla* の転写と同方向にあるときにもっとも高い阻害効果が現われたことから裏付けられる。

pZK343 に導入した *bla* のフレームシフト変異は、YT297 株に対する高温致死性を *bla* の欠失変異を持つプラスミドと同程度に失わしめた (pZK361)。これは、阻害の主原因が *bla* の過剰発現であることと、*bla* の mRNA よりも蛋白質産物が阻害効果をもたらしていることを強く示唆している。

		Colony formation (42 / 30 °C)	
		YT297	
		+Drug	-Drug
pZK58		5.0×10^{-4}	4.3×10^{-4}
pZK332D		3.2×10^{-4}	7.9×10^{-4}
pZK332DR		2.7×10^{-4}	4.1×10^{-4}
pZK343		5.0×10^{-4}	2.2×10^{-3}
pZK343R		0.039	0.054
pZK346		NT	0.048
pZK346R		NT	0.040
pZK361		NT	0.040

図18 pZK58 と、そのpBR322 領域の変異プラスミド

図16と同様にして示す。詳細は本文参照。

▽はフレームシフト変異の箇所。この変異はpBR322にただ1箇所存在するPvuI部位をT4 DNAポリメラーゼにより平滑末端化して、再結合することにより得られた。

第5節 *sopA* プロモーターを持つプラスミドによる安定DNA複製の阻害

bla の上流に *sopA* プロモーターを順方向にもつ pBR322 由来プラスミドが安定DNA複製を阻害することがわかった（図19）。前節の結果が安定DNA複製の阻害と対応していることを確かめるため、第2節と同様にして、*sopA* プロモーターを含む mini-F 断片を *bla* と順方向に持つプラスミド (pZK359)、同じ断片を逆方向に持つプラスミド (pZK359R)、および、同断片から *sopA* プロモーター領域を欠失したプラスミド (pZK362) を用いて、取り込み実験を行った。

予想どおり、pZK359 のみが安定DNA複製を明らかに阻害した（図19）。このとき有意なDNAの分解は見られなかったこと（図20）から、確かに安定DNA複製の阻害が起こっていることが示された。また、pZK359R はYT297 に対する部分的な高温致死性を残している（図16）が、安定DNA複製はpZK362 とほぼ同様であり、阻害効果は見られなかった（図19）。pZK359 と pZK359R は同一の *sopA* プロモーターを含む mini-F 断片を互いに逆方向に持つことによって、対照的な表現型を示している。このことから、安定DNA複製の阻害には *bla* の大量供給のみで十分であると考えられる。

第6節 *lac* プロモーターを持つ pBR322 由来プラスミドによる安定DNA複製の阻害

bla の過剰発現が安定DNA複製の阻害原因であるなら、*sopA* プロモーター以外のプロモーターからでも同じ結果を引きださうる筈である。予想どおり、pUC19 由来の *lac* プロモーターを *bla* 上流、順方向に持つ

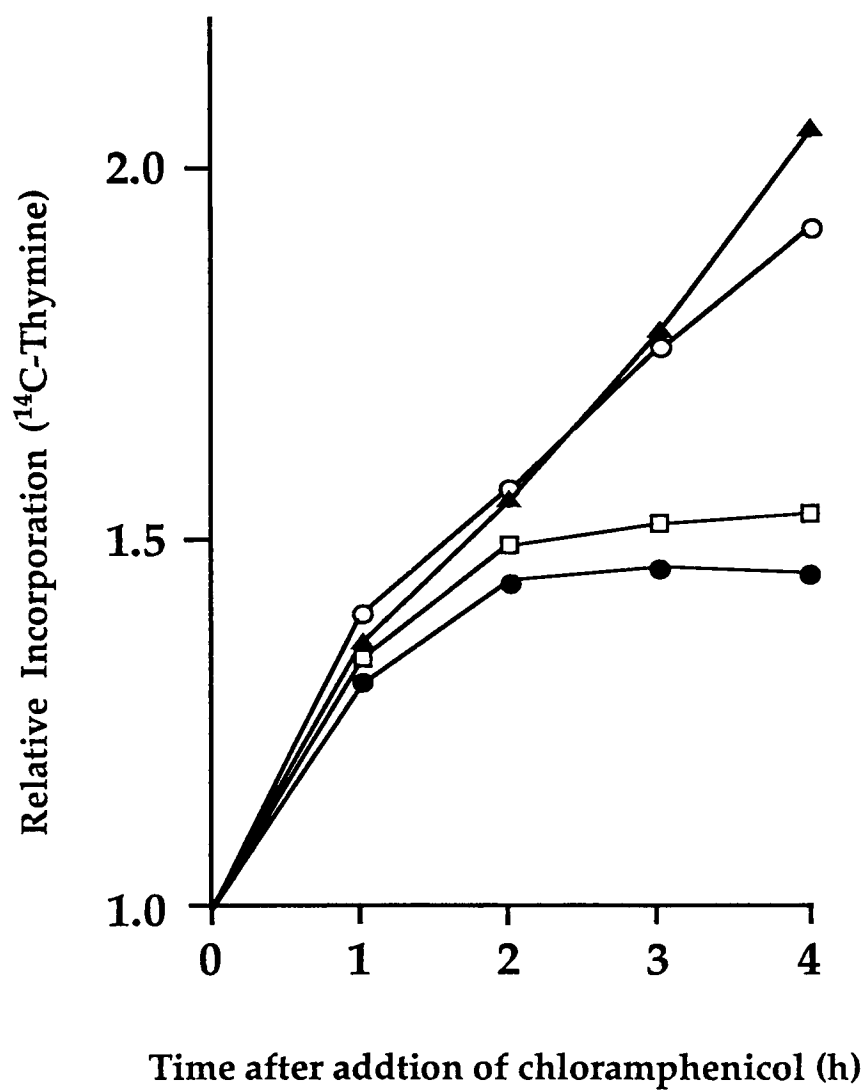


図19 KA152株における、プラスミドによる安定DNA複製の阻害
 図15と同様にして調べた。▲、pZK362。●、pZK359。
 ○、pZK359R。□、pZK353。

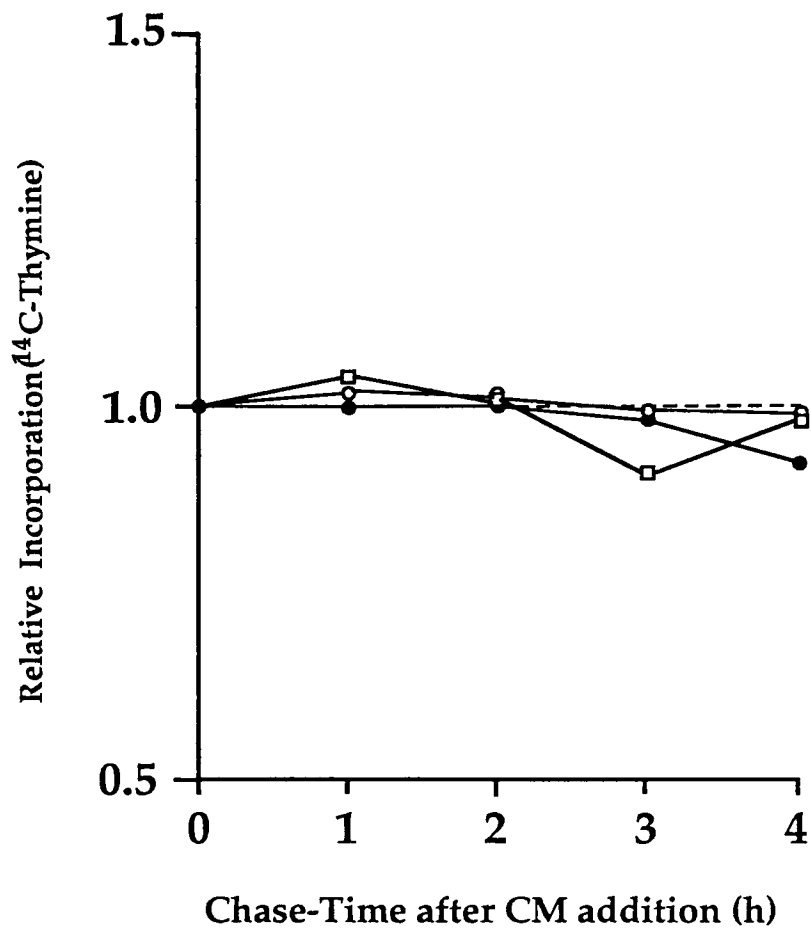


図 2 0 形質転換された、KA152 株の染色体DNAの安定性

各培養液の菌は一晚培養によって標識された。同じ培地で、対数増殖期まで培養した後、短時間の遠心によって、菌を集め、あらかじめ、保温しておいた非放射性チミン (25 μ g/ml) を含む培地(M9)で洗浄した。再び、この培地に菌を混濁させ、クロラムフェニコールを加えて(0時間とした)、42°Cで養を続けた。●、pBR322。○、pZK353。□、pZK359R。

pZK353 は安定DNA複製を阻害することが明らかになった（図 19）。また、取り込み実験の間に、DNA の分解が起こっていないことを確認した（図 20）。これは、DNAの分解による取り込み量の減少が生じているのではなく、確かに安定DNA複製の阻害が起こっていることを裏付ける。以上より、安定DNA複製の阻害に関して、*sopA* プロモーターを含むmini-F 領域に特異性はなく、*bla* の大量発現のみが必要であることが示された。

第 7 節 抑制変異株の分離と解析

β -ラクタマーゼ大量発現によると思われる安定DNA複製の阻害機構を知るため、また、この障害を解除し得る変異がどのようなものであるかを知るため、pZK58 を持つYT297 株から多数の独立の高温耐性変異株を分離して解析した。これらについて、まず、プラスミドの変異によるものではないことを確かめた。さらに、現在までの予備的な解析の結果、次の4種類に分類された（未発表）。

(1) pZK58 のコピー数不変。変異遺伝子座、未同定。ただし、*dnaA* の復帰変異またはその抑制変異ではない。これは、以下の3種についても同じである。

(2) pZK58 およびpBR322 のコピー数が著しく低下している。変異遺伝子座、未同定。

(3) pZK58 のコピー数不変。変異遺伝子座、約90分。リファンピシン耐性。P1形質導入によって、高温耐性変異とリファンピシン耐性とは分離されないことから、*rpoB* 変異と思われる。高温耐性とリファンピシン耐性の二重選択で分離された。

(4) pZK58 のコピー数不変。変異遺伝子座、約36分。予想された部

位に相当する領域を持つDNA断片（Clarke and Carbon のコレクション[13]由来）をpZK58 に連結すると、YT297 株に対する高温致死性が失われた。このときの連結はpZK58 のpBR322 領域内*Sa*II 部位であるため、*bla* の発現には影響はないはずと思われる。またプラスミドコピー数にも著しい変化はない。系統的な欠失変異を分離して、約1.2kb の最小必須領域が明らかとなった（図2 1）。この因子が、元の抑制変異を持つ遺伝子と同一であるか否かはまだ不明だが、少なくとも現時点では、いわゆる、マルチコピーサプレッサーを分離したと考えられる。

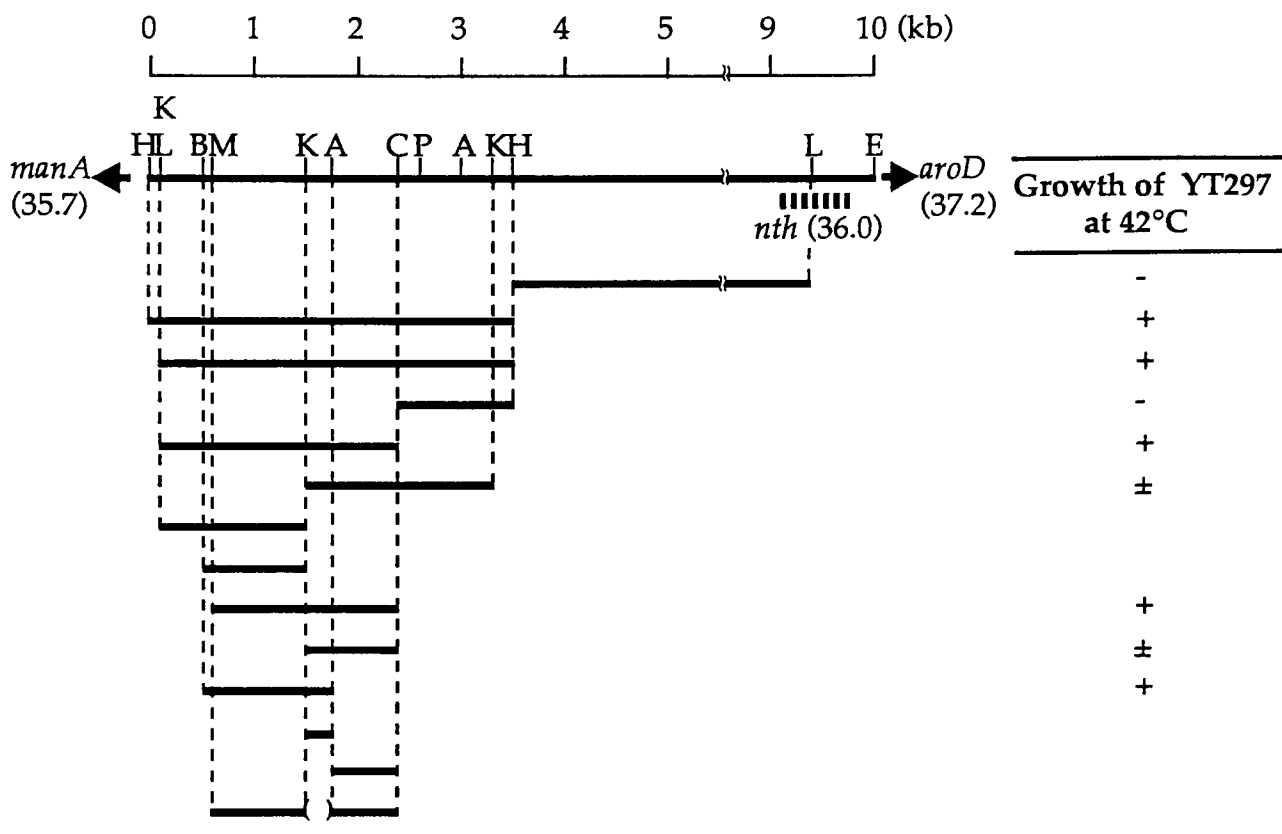


図 2 1 形質転換されたYT297 株の高温での増殖

pLC9-9 および pLC28-48 [14] から全長約 10kb の染色体由来 DNA 断片をサブクローンし、制限酵素地図を作成した。次に、各制限酵素断片を分離し、必要な場合、T4 DNA ポリメラーゼ処理によって平滑末端化した。これらの断片を、同じ処理によって平滑末端となっている pZK58 の *Sa*II 部位に挿入した。プラスミド名は、上から順に、pZK293、pZK294、pZK295、pZK307、pZK306、pZK312、pZK313、pZK310、pZK314、pZK317、pZK321、pZK322、pZK323、pZK329。遺伝子記号の後の括弧内の数字は染色体関連地図上の位置 [3]。形質転換された YT297 株の高温での増殖はアンピシリンを含む L 培地に適当に希釈した菌液を塗布して調べた。記号 + は良好な増殖、± は部分的な増殖、- は増殖しないことを示す。制限酵素の記号は以下のとおり。A、*Acc*I。B、*Ba*II。C、*Cl*aI。E、*Eco*RI。H、*Ba*mHI、K、*Kp*nI。L、*Sa*II。M、*Sma*I。P、*Pvu*II。

考察

第1節 mini-F-pBR322 複合プラスミドによるYT297 株の高温致死

mini-F-pBR322 複合プラスミドである pZK58 の形質転換によって、高温での染色体複製を安定DNA複製に依存するYT297 株が高温感受性となることは既に報告されていた。ただし、その報告によるとYT297 株が高温感受性となるためには、mini-F の *ori-2* が完全であること、および、プラスミド独自の複製開始因子 RepE が必要とされていた[61]。しかし今回の新たな欠失変異による調査は、必要性に関するこのどちらの観察も誤りであったことを明らかにした（図16）。

特に、*ori-2* の必要性に関しては元の報告と全く同じ構造を持つはずのプラスミドを改めて作成したところ、形質転換されたYT297 株は高温感受性であった。つまり、元の観察が再現されなかった。加えて、*ori-2* の他領域の欠失でも同じであった。

また、*repE* 遺伝子に関しても欠失によってYT297 株の高温感受性は失われなかった。元の報告では *repE* アンバー変異株を用いている。しかしながら、このアンバー変異株はニトロソグアニジン処理によって得られたものであり、しかも、塩基配列は調べられていない[55]。よって、*repE* 遺伝子外の領域に何らかの変異が潜伏している可能性がある。

元の報告によると全 *sop* 領域を持つ mini-F-pBR322 複合プラスミド (pKP10163) も pZK58 と同じ致死性を持つ[61]。しかしながら、このプラスミドは pBR322 の *bla* 上流に *cat* 遺伝子断片があり、この断片内から転写が *bla* に流入している可能性が高い。実際に、pKP10163 の pBR322 部分を逆方向にするとYT297 株に対する高温致死性が失われ

た（データ略）。

本研究の系統的にpZK58 から作成された欠失変異によって、YT297 株の高温感受性に対するmini-F の必要因子は*sopA* プロモーター領域のみであることが明らかとなった（図 1 6）。そして、最終的には、pBR322 内の*bla* (β -ラクタマーゼ) 遺伝子の過剰発現が安定DNA複製に阻害効果を持つと考えられるに至った（図 1 9）。

第 2 節 大量供給された β -ラクタマーゼによる安定DNA複製の阻害

大量に供給された β -ラクタマーゼがなぜ安定DNA複製を阻害するのは現時点ではよくわからない。

β -ラクタマーゼは β -ラクタム抗生物質を分解するが、その反応機構は細胞壁ペプチドグリカン架橋酵素と極めて類似している[59]。可能性は少ないが、 β -ラクタマーゼの大量供給は細胞壁合成に影響を与え、細胞分裂への派生効果を経て安定DNA複製にも阻害をもたらすのかも知れない。

高温において分泌欠損が起こる*secY* 変異株では低温でも β -ラクタマーゼの大量供給によって分泌が阻害され、細胞増殖に悪影響が見られる[34]。 β -ラクタマーゼの大量供給だけでも、蛋白質の分泌に部分的な障害が表われ、安定DNA複製に必要な膜蛋白質の機能が欠損するのかも知れない。または、細胞膜の構造的な変化が起こり、阻害的な効果の原因となるのかも知れない。安定DNA複製においては細胞膜の影響に関して今まで全く調べられていない。

β -ラクタマーゼ（前駆体）は*in vivo*でGroE 蛋白質と相互作用しているらしいことが示されている[50]。 β -ラクタマーゼ大量発現は、安定DNA複製に必要な因子に対して競合的に相互作用し、結果的に、その

因子の不足から安定DNA複製が阻害されるのかも知れない。

第3節 抑制変異株の分離と解析

β -ラクタマーゼ大量発現によると思われる安定DNA複製の阻害機構を知るため、また、この障害を解除し得る変異がどのようなものであるかを知るため、pZK58を持つYT297株から、染色体上の変異によって高温耐性となった抑制変異株を分離して解析した。そのうちの1株はP1マッピングによって抑制変異の位置が約35.9分にあるらしいことが示された。

もし、問題の阻害原因が、*bla*の大量発現によって起こる、安定DNA複製の必須因子の不足であるなら、その因子の大量発現によって阻害は解除されるはずである。そこで、Clarke and Carbonのプラスミドバンクから、約35.9分から約36.0分の染色体由来DNA断片をサブクローンしてpZK58に組み込み、マルチコピーとしたところ、ある領域を含むものは、YT297株を高温耐性に復帰させることができた(図2 1)。

この領域の因子が元の変異因子と同一かどうか知るために、欠失変異株の作成を試みたが現在まで成功していない。この領域にDNAレベルで存在が明らかにされている遺伝子はない。

材料と方法

1) 菌株、ファージ、プラスミド

菌株はすべて大腸菌 K-12 由来である (表 5)。ファージ λ *imm*²¹ *dnaA*⁺ は今井六雄博士から分与された。pGroE は楠川典子氏から分与された。これは、*groE* オペロンを含む pBR322 由来プラスミド pFO12[18] を元に作成された (図 6)。pTSO182 は、*oriC* 最小領域と隣接する *mioC* 遺伝子を含む 2.1kb の染色体由来 DNA を pBR322 の *SaI* 部位にクローンしている [65]。pZK243 は、*terC* 領域 (30.9 分) に位置する染色体由来 DNA を pBR322 にクローンしたプラスミドである。このプラスミドを *HindIII* と *EcoRI* で処理すると、*terC* 領域の Bouché Map 上 229kb の位置に相当する 0.8kb の DNA 断片が得られる [8]。他のプラスミドの構造は表 6 に示した。ただし、図 2 1 におけるプラスミドに関しては本文中に説明した。

2) 培地

寒天培地は 1.2% の寒天を含む。必要に応じ、25 または 50 $\mu\text{g/ml}$ のチミンを含む。

L 培地 (pH 7.4)

1.0%	バクトトリプトン (Difco)
0.5%	イーストエキストラクト (Difco)
0.5%	NaCl

ME 培地

0.02%	MgSO ₄
0.2%	クエン酸
1.0%	K ₂ HPO ₄
0.35%	NaNH ₄ HPO ₄
2 $\mu\text{g/ml}$	ビタミン B ₁
0.5%	グルコース

表 5 菌株

Strain	Relevant Genotype ^a	Source or Reference
KH5402-1	<i>ilv</i> ^b	[40]
KH5402-1A	KH5402-1 (λ <i>imm</i> ²¹ <i>dnaA</i> ⁺)	This work
KA152	KH5402-1 <i>rnh</i> -199 (Am) <i>zaf</i> -8::Tn10	This work
KA160	KA152 <i>dnaA</i> 46 <i>zid</i> -131::Tn5	This work
KA237	KH5402-1 <i>dnaA</i> 5 <i>zid</i> -131::Tn5 <i>rnh</i> :: <i>cat</i>	This work
KA413	KH5402-1 <i>ilv</i> ⁺ <i>dnaA</i> 46 (Ts)	This work
KA413A	KA413 (λ <i>imm</i> ²¹ <i>dnaA</i> ⁺)	This work
KA421	KA413 <i>rnh</i> :: <i>cat</i>	This work
YT297	KH5402-1 <i>ilv</i> ⁺ <i>dnaA</i> 17(Am) <i>rnh</i> -199	[62]
YT411	KH5402-1 <i>rnh</i> :: <i>cat</i>	Murakami Y.
YT427	KH5402-1 <i>dnaA</i> ::Tn10 <i>rnh</i> :: <i>cat</i>	Murakami Y.
YT429	KH5402-1 <i>rnh</i> :: <i>cat</i> <i>oriC</i> <i>del</i> -1071	Murakami Y.
PLK1434	λ <i>rev</i> <i>cl</i> 857 <i>del</i> [λ S-kb247] ^c	[30]

^a すべての遺伝子記号はBackmann [3]に拠っている。

Ts、高温感受性。Am、アンバー変異。

^b 他の遺伝子変異は: *thyA*、*tyrA* (Am)、*trpE*9829 (Am)、*metE*、*deo*、*supF*6 (Ts)。

^c 他の遺伝子変異は: *trpR*、*trpA*9605、*his*-29、*ilv*、*pro*-2、*arg*-427、*thyA*、*deoB* または *deoC*、*tsx*、*rac*⁻。この菌では、潜在性 λ *rev* ファージから *trg* 遺伝子までの *terC* 領域が欠失している。文献 [30]を参照。

表6 プラスミド

Strain	pBR322 region	mini-F region or pUC19 region*
pBR322	(full length)	
pZK58	29-4361 (<i>Hin</i> dIII- <i>Eco</i> RI)	4780-6947 (<i>Xho</i> I- <i>Kpn</i> I)
pZK350	29-4361 (<i>Hin</i> dIII- <i>Eco</i> RI)	4913-6947 (<i>Bgl</i> II- <i>Kpn</i> I)
pZK300	29-4361 (<i>Hin</i> dIII- <i>Eco</i> RI)	4780-4913 (<i>Xho</i> I- <i>Bgl</i> II) 4959-6947 (<i>Xba</i> I- <i>Kpn</i> I)
pZK278D	29-4361 (<i>Hin</i> dIII- <i>Eco</i> RI)	4780-4959 (<i>Xho</i> I- <i>Xba</i> I) 5072-6947 (<i>Alu</i> I- <i>Kpn</i> I)
pZK349	29-4361 (<i>Hin</i> dIII- <i>Eco</i> RI)	4780-5258 (<i>Xho</i> I- <i>Sma</i> I) 5740-6947 (<i>Pvu</i> II- <i>Kpn</i> I)
pZK342	29-4361 (<i>Hin</i> dIII- <i>Eco</i> RI)	4780-5921 (<i>Xho</i> I- <i>Hpa</i> I) 6331-6947 (<i>Eco</i> 47III- <i>Kpn</i> I)
pZK319	29-4361 (<i>Hin</i> dIII- <i>Eco</i> RI)	4780-6331 (<i>Xho</i> I- <i>Eco</i> 47III)
pZK305	29-4361 (<i>Hin</i> dIII- <i>Eco</i> RI)	4780-6398 (<i>Xho</i> I- <i>Dra</i> I)
pZK351	665-4361 (<i>Sal</i> I- <i>Eco</i> RI)	6331-6947 (<i>Eco</i> 47III- <i>Kpn</i> I)
pZK360	185-4361 (<i>Eco</i> RV- <i>Eco</i> RI)	6398-6947 (<i>Dra</i> I- <i>Kpn</i> I)
pZK362	4361-4361 (<i>Eco</i> RI- <i>Eco</i> RI)	6488-6947 (<i>Eco</i> RI- <i>Kpn</i> I)
pZK359	29-4361 (<i>Hin</i> dIII- <i>Eco</i> RI)	6331-6597 (<i>Eco</i> 47III- <i>Msp</i> I)
pZK359R	29-4361 (<i>Hin</i> dIII- <i>Eco</i> RI)	6331-6597 (<i>Eco</i> 47III- <i>Msp</i> I)
pZK332D	2068-4361 (<i>Pvu</i> II- <i>Eco</i> RI)	4780-6947 (<i>Xho</i> I- <i>Kpn</i> I)
pZK332DR	2068-4361 (<i>Pvu</i> II- <i>Eco</i> RI)	4780-6947 (<i>Xho</i> I- <i>Kpn</i> I)
pZK343	4361-4361 (<i>Eco</i> RI- <i>Eco</i> RI)	4780-6947 (<i>Xho</i> I- <i>Kpn</i> I)
pZK343R	4361-4361 (<i>Eco</i> RI- <i>Eco</i> RI)	4780-6947 (<i>Xho</i> I- <i>Kpn</i> I)
pZK346	4361-3232 (<i>Eco</i> RI- <i>Dra</i> I)	4780-6947 (<i>Xho</i> I- <i>Kpn</i> I)
pZK346R	4361-3232 (<i>Eco</i> RI- <i>Dra</i> I)	4780-6947 (<i>Xho</i> I- <i>Kpn</i> I)
pZK361	4361-4361 (<i>Eco</i> RI- <i>Eco</i> RI)	4780-6947 (<i>Xho</i> I- <i>Kpn</i> I)
pZK353	187-29 (<i>Eco</i> RV- <i>Hin</i> dIII)	447-628 (<i>Hin</i> dIII- <i>Pvu</i> II)*

(続き)

表6 プラスミド

pZK58 のmini-F 領域の両端はpUC19由来のマルチクローニングサイトと連結している[62]。ここには、それぞれ、括弧内の制限酵素部位をもって、プラスミドに含まれる領域を示した。制限酵素部位の位置は、pBR322 は文献[5、69]にしたがって示した。mini-F は EMBL Data Base に基づき、f5 断片の最初のEcoRI 部位を1とした。pUC19は文献[83]にしたがった。互換性のない末端はT4 DNA ポリメラーゼにより平滑末端化して連結した。pZK342 はpKV5110由来の*repE* のC末端を含む[37]。pZK362 のmini-F 領域の5'末は、*sopA* プロモーターは含まないがSD配列まで含む合成DNA由来である[60]。

通常、以上に加えて、0.3% カザミノ酸と25 μ g/ml トリプトファンを含む培地として用いた。

M9培地

1.28% NaHPO₄

0.3% KH₂PO₄

0.05% NaCl

0.1% NH₄Cl

2 μ g/ml ビタミンB₁

0.5% グルコース

通常、以上に加えて、0.3% カザミノ酸と25 μ g/ml トリプトファンを含む培地として用いた。

なお、必要に応じ使用した抗生物質は以下のとおり。

40または50 μ g/ml アンピシリン

20または120 μ g/ml カナマイシン

300または600 μ g/ml クロラムフェニコール

750 μ g/ml ストレプトマイシン

100 μ g/ml リファンピシン

3) 形質転換

Hanahan 法[25]にしたがって、FSBを使用して行なった。受容菌に高温感受性株を含む場合、熱ショック後、L培地中30°C、90分の保温を経て、選択培地に塗布した。

4) DNAおよび蛋白質合成の測定

3 μ Ci/25 μ g/ml [2-¹⁴C] チミンと 3 μ Ci/ml [4,5-³H(N)] リジン (88.0Ci/mmol) または 3 μ Ci/ml [4,5-³H(N)] ロイシン (53.0Ci/mmol) を加えた、最小(MEまたはM9)培地にて、菌を一晩培養した。同培地にて20倍に希釈した後、菌が1または2 $\times 10^8$ /ml まで増殖した時点で、蛋白質合成阻害剤を加えた。この時点をも0時間として、以後、経時的に50 μ l ずつ採取し、3MMフィルターディスク(Whatmann) にしみ込ませた。これをただちに、冷 5% TCA (トリクロロ酢酸) に浸し酸不溶画

分を回収した。次に、冷 5% TCA にて1回、冷エタノールにて2回洗浄し、乾燥させた後、放射活性を液体シンチレーションカウンター (Packard)にて計測した。放射性チミンおよびアミノ酸は、それぞれ、ARC社(American Radiolabeled Chemicals) およびdu Pont 社から購入した。

5) プロープDNA の作成

oriC および *terC* に対応するプロープの作成のため、pTSO182 および pZK243 を、それぞれ、*Sa*II および、*Hind*III、*Eco*RI で処理した。それぞれ、*oriC* および *terC* に当たる DNA断片を Low Melting Point Agarose (BRL) から、切りだして精製した。約300ng の *oriC* DNA断片と約900ng の *terC* DNA断片とをランダムプライマー法によって、DNA ポリメラーゼ I・クレナウ断片と[α -³²P]dCTP (du Pont) を用いて標識した。それぞれ、10⁸cpm 以上のカウントが得られた。

6) 遺伝子量(Gene Dosage)の測定

42°Cで対数増殖相にある菌をKlett Unit でOD (濁度)=40 に至った時点にて、クロラムフェニコールを加えた。3分後、30°Cに移行し、以後経時的に100 μ lずつ採取して、冷 5% TCA 中で固定した。菌を500 μ l 2M Tris-HCl (pH7.8) で洗浄した後、100 μ l 1N NaOH 3M NaCl に懸濁した。溶菌とRNA 完全分解のため、これを沸騰水中で5分間おいた。室温まで冷却後、100 μ l 3M KCOOH (pH 4.8) を加えて中和した。40 μ l 分をBA85 ニトロセルロース紙に吸着させた。以後、通常のブランクハイブリダイゼーション法に従った[69]。ただし、ハイブリダイゼーションは45°Cで24時間行なった。ハイブリダイゼーション後の放射活性の測定は、イメージアナライザー(富士フィルム)を用いて行な

った。

7) イムノブロッティング

42°Cで対数増殖相にある菌をKlett Unit でOD=40 に至った時点にて氷中で急冷した。OD_{600nm}=0.5 となるように調整し、1ml 分の懸濁液を冷 5% TCA 中で固定した。アセトンで洗浄後、溶菌、変性させて10.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった[72]。セミドライブロッティング法にてゲル中の蛋白質をニトロセルロース紙に移行させた。1次抗体は、関水和久博士（東大薬学部）から分与された、アフニティ精製・抗DnaA 抗体を用いた。2次抗体は、ペルオキシダーゼ結合抗ウサギ抗体を用い、酸化反応による色素生成法(コニカ)で染色した。

文献

1. Atlung, T., E. S. Clausen and F. G. Hansen. (1985) Autoregulation of the *dnaA* gene of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **200**: 442-450
2. Atlung, T., A. Løbner-Olesen and F. G. Hansen. (1987) Overproduction of DnaA protein stimulates initiation of chromosome and minichromosome replication in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 51-59
3. Bachmann, B. J. (1990) Linkage map of *Escherichia coli* K-12 Edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**: 130-197
4. Baker, T. A., K. Sekimizu, B. E. Funnell and A. Kornberg. (1986) Extensive unwinding of the plasmid template during staged enzymatic initiation of DNA replication from the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *Cell.* **45**: 53-64
5. Balabás, P., X. Soberón, E. Merino, M. Zurita, H. Lomeli, F. Valle, N. Flores and F. Bolivar. (1986) Plasmid vector pBR322 and its special purpose derivative a review. *Gene.* **50**: 3-40
6. Bialy, H. and T. Kogoma. (1986) RNase H is not involved in the induction of stable DNA replication in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **165**: 321-323
7. Bochkareva, E. S., N. M. Lissin and A. S. Girshovich. (1988) Transient association of newly synthesized unfolded proteins with the heat-shock GroEL protein. *Nature.* **336**: 254-257
8. Bouché, J. P. (1982) Physical map of a 470×10^3 base-pair region flanking the terminus of DNA replication in the *Escherichia coli* K12 genome. *J. Mol. Biol.* **154**: 1-20
9. Bramhill, D. and A. Kornberg. (1988) Duplex opening by *dnaA* protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell.* **52**: 743-755
10. Bramhill, D. and A. Kornberg. (1988) A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell.* **54**: 915-918
11. Braun, R. E., K. O'Day and A. Wright. (1985) Autoregulation of the DNA replication gene *dnaA* in *E. coli* K-12. *Cell.* **40**: 159-169
12. Chiaramello, A. and J. W. Zyskind. (1989) Expression of *Escherichia coli dnaA* and *mioC* genes as a function of growth rate. *J. Bacteriol.* **171**: 4272-4280
13. Clarke, L. and J. Carbon. (1979) "Selection of specific clones from colony banks by suppression or complementation tests." in: *Methods in Enzymology*. R. Wu(ed.) Academic Press. New York.
14. Cunningham, R. P. and B. Weiss. (1985) Endonuclease III (*nth*) mutants of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 474-478

15. de Massy, B., O. Fayet and T. Kogoma. (1984) Multiple origin usage for DNA replication in *sdrA(rnh)* mutants of *Escherichia coli* K 12: initiation in the absence of *oriC*. J. Mol. Biol. 178: 227-236
16. Donachie, W. D. (1968) Relationship between cell size and time of initiation of replication. Nature. 219: 1077-1079
17. Ellis, J. (1987) Proteins as molecular chaperones. Nature. 328: 378-379
18. Fayat, O., J.-M. Louarn and C. Georgopoulos. (1986) Suppression of the *Escherichia coli dnaA46* mutation by amplification of the *groES* and *groEL* genes. Mol. Gen. Genet. 202: 435-445
19. Fayat, O., T. Ziegelhoffer and C. Georgopoulos. (1989) The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. J. Bacteriol. 171: 1379-1385
20. Friedman, D. I., E. R. Olson, K. Tilly, C. Georgopoulos, I. Herkowitz and F. Branuett. (1984) Interactions of bacteriophage and host macromolecules in the growth of bacteriophage λ . Microbiol. Rev. 48: 299-325
21. Fuller, R. S., B. E. Funnell and A. Kornberg. (1984) The *dnaA* protein complex with the *E. coli* chromosomal replication origin (*oriC*) and other DNA sites. Cell. 38: 889-900
22. Fuller, R. S. and A. Kornberg. (1983) Purified *dnaA* protein in initiation of replication at the *Escherichia coli* chromosomal origin of replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 5817-5821
23. Goloubinoff, P., J. T. Christeller, A. A. Gatenby and G. H. Lorimer. (1989a) Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. Nature. 342: 884-889
24. Goloubinoff, P., A. A. Gatenby and G. H. Lorimer. (1989b) GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. Nature. 337: 44-47
25. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580
26. Hansen, E. B., T. Atlung, F. G. Hansen, O. Skovgaard and K. von Meyenburg. (1984) Fine structure genetic map and complementation analysis of mutations in the *dnaA* of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 196: 387-396
27. Hansen, E. B. and M. B. Yarmolinsky. (1986) Host participation in plasmid maintenance: dependence upon *dnaA* of replicons derived from P1 and F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 4423-4427
28. Hansen, F. G. and K. V. Rasmussen. (1977) Regulation of the *dnaA* product in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 155: 219-225

29. Hemmingsen, S. M., C. Woolford, S. M. van der Vies, K. Tilly, D. T. Dennis, C. P. Georgopoulos, R. W. Hendrix and R. J. Ellis. (1988) Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature*. **333**: 330-334
30. Henson, J. M., B. Kopp and P. L. Kuempel. (1984) Deletion of 60 kilobase pairs of DNA from the *terC* region of the chromosome of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **193**: 263-268
31. Hiraga, S. and T. Saitoh. (1974) Initiation of DNA replication in *Escherichia coli*: Characteristics of the initiation process in *dna* mutants. *Mol. Gen. Genet.* **132**: 49-62
32. Hirota, Y., J. Mordoh and F. Jacob. (1970) On the process of cellular division in *Escherichia coli*. III. Thermosensitive mutants of *Escherichia coli* altered in the process of DNA initiation. *J. Mol. Biol.* **53**: 369-387
33. Hughes, P., A. Landouski and M. Kohiyama. (1988) A novel role for cAMP in the control of the activity of the *E. coli* chromosome replication initiator protein, DnaA. *Cell*. **55**: 343-350
34. Ito, K., Y. Hirota and Y. Akiyama. (1989) Temperature-sensitive *sec* mutant of *Escherichia coli*: inhibition of protein export at permissive temperature. *J. Bacteriol.* **171**: 1742-1743
35. Jacob, F., S. Brenner and F. Cuzin. (1963) On the process regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Quant. Biol.* **28**: 329-348
36. Jenkins, A. J., J. B. March, I. R. Oliver and M. Masters. (1986) A DNA fragment containing the *groE* genes can suppress mutations in the *Escherichia coli dnaA* genes. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 446-454
37. Kawasaki, Y., C. Wada and T. Yura. (1990) Roles of *Escherichia coli* heat shock proteins DnaK, DnaJ and GrpE in mini-F plasmid replication. *Mol. Gen. Genet.* **220**: 277-282
38. Kellenberger-Gujer, G. and A. J. Podhajski. (1978) Interactions between the plasmid λdv and *Escherichia coli dnaA* mutant. *Mol. Gen. Genet.* **162**: 17-22
39. Kellenberger-Gujer, G., A. J. Podhajski and L. Caro. (1978) A cold sensitive *dnaA* mutant of *E. coli* which overinitiates chromosome replication at low temperature. *Mol. Gen. Genet.* **162**: 9-16
40. Kimura, M., T. Nagata and Y. Yura. (1980) Isolation and characterization of *Escherichia coli dnaA* amber mutants. *J. Bacteriol.* **144**: 825-834
41. Kline, B. C. (1985) A review of mini-F plasmid maintenance. *Plasmid*. **14**: 1-16
42. Kline, B. C., T. Kogoma, J. E. Tam and M. S. Shields. (1986) Requirement of the *Escherichia coli dnaA* gene product for plasmid F maintenance. *J. Bacteriol.* **168**: 440-443

43. Kogama, T., N. L. Subia and K. von Meyenburg. (1985) Function of ribonuclease H in initiation of DNA replication in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. **200**: 103-109
44. Kogoma, K. (1986) RNase H-defective mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **166**: 361-363
45. Kogoma, T. and B. C. Kline. (1987) Integrative suppression of *dnaA*(Ts) mutations mediated by plasmid F in *Escherichia coli* in a DnaA-dependent process. Mol. Gen. Genet. **210**: 262-269
46. Kogoma, T., T. A. Torrey and M. J. Connaughton. (1979) Induction of UV-resistant DNA replication in *Escherichia coli*: Induced stable DNA replication as an SOS function. Mol. Gen. Genet. **176**: 1-9
47. Kogoma, T. and K. von Meyenburg. (1983) The origin of replication, *oriC*, and the *dnaA* protein are dispensable in stable DNA replication (*sdrA*) mutants of *Escherichia coli*. EMBO J. **2**: 463-468
48. Küherer, C., H. Lother, R. Kölling, M.-A. Shauzu and W. Messer. (1986) Regulation of transcription of the chromosomal *dnaA* gene of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. **205**: 115-121
49. Kusakawa, N. and T. Yura. (1988) Heat shock protein GroE of *Escherichia coli*: key protective roles against thermal stress. Genes Dev. **2**: 874-882
50. Kusakawa, N., T. Yura, C. Ueguchi, Y. Akiyama and K. Ito. (1989) Effects of mutations in heat-shock genes *groES* and *groEL* on protein export in *Escherichia coli*. EMBO J. **8**: 3517-3521
51. Laminet, A. A., T. Ziegelhoffer, G. Georgopoulos and A. Pluckthun. (1990) The *Escherichia coli* heat shock proteins GroEL and GroES modulate the folding of the β -lactamase precursor. EMBO J. **9**: 2315-2319
52. Lark, K. G. (1972) Evidence for direct involvement of RNA in the initiation of DNA replication in *E. coli* 15T⁻. J. Mol. Biol. **64**: 47-60
- 52a. Leonard, A. C. and C. H. Helmstetter. (1986) Cell cycle-specific replication of *Escherichia coli* minichromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83**: 5101-5105
53. Løbner-Olesen, A., K. Skarstad, F. G. Hansen, K. von Meyenburg and E. Boye. (1989) The DnaA protein determines the initiation mass of *Escherichia coli* K-12. Cell. **57**: 881-889
54. Lycett, G. W., E. Orr and R. H. Pritchard. (1980) Chloramphenicol releases a block in initiation of chromosome replication in a *dnaA* strain of *Escherichia coli* K12. Mol. Gen. Genet. **178**: 329-336
55. Maki, S., M. Kuribayashi, T. Miki and T. Horiuchi. (1983) An amber replication mutant of F plasmid mapped in the minimal replication region. Mol. Gen. Genet. **191**: 231-237

56. Matsui, M., A. Oka and M. Takanami. (1985) Sites of *dnaA* protein-binding in the replication origin of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J. Mol. Biol.* 184: 529-533
57. McMacken, R., L. Silver and C. Geogopoulos. (1987)"DNA replication." in: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. F.C. Neidhart, I.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umberger(ed.) Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C.
58. McMullin, T. W. and R. L. Hallenberg. (1988) A highly evolutionarily conserved mitochondrial protein is structurally related to the protein encoded by the *Escherichia coli groEL* gene. *Mol. Cell. Biol.* 8: 371-380.
59. 水島昭二、三浦謹一郎 (1979) "細菌の解剖" 講談社、東京
60. Mori, H., A. Kondo, A. Ohshima, T. Ogura and S. Hiraga. (1986) Structure and function of the F plasmid gene essential for partitioning. *J. Mol. Biol.* 192: 1-15
61. 村上洋太 (1987) 「大腸菌F因子の複製における *dnaA* 遺伝子の関与に関する分子遺伝学的研究」学位申請論文
62. Murakami, Y., H. Ohmori, T. Yura and T. Nagata. (1987) Requirement of the *Escherichia coli dnaA* gene function for *ori-2* dependent mini-F plasmid replication. *J. Bacteriol.* 169:
63. Nagata, T., Y. Murakami and M. Imai. (1988) Requirement of the *Escherichia coli dnaA* gene function for integrative suppression of *dnaA* mutations by plasmid R100-1. *Mol. Gen. Genet.* 213: 163-165
64. Neidhart, F. C. and R. A. VanBogelen. (1987)"Heat shock response." in: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. F.C. Neidhart, I.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umberger(ed.) Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C.
65. Oka, A., K. Sugimoto and M. Takanami. (1980) Replication origin of the *Escherichia coli* K-12 chromosome: the size and structure of the minimum DNA segment carrying the information for autonomous replication. *Mol. Gen. Genet.* 178: 9-20
66. Pierucci, O., C. E. Helmstetter, M. Rickert, M. Weinberger and A. C. Leonard. (1987) Overexpression of the *dnaA* gene in *Escherichia coli* B/r: Chromosomal and Minichromosome replication in the presence of rifampin. *J. Bacteriol.* 169: 1871-1877
67. Rothman, J. E. (1989) Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. *Cell.* 59: 591-601
68. Sakakibara, Y. and S. Yuasa. (1982) Continuous synthesis of the *dnaA* product of *Escherichia coli* in the cell cycle. *Mol. Gen. Genet.* 186: 87-94

69. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
70. Sekimizu, K., D. Bramhill and A. Kornberg. (1987) ATP activates dnaA protein in initiating replication of plasmids bearing the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell*. **50**: 259-267
71. Sekimizu, K. and A. Kornberg. (1988) Cardiolipin activation of dnaA protein, the initiation protein of replication in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**: 7131-7135
72. Sekimizu, K., B. Y.-M. Yung and A. Kornberg. (1988) The dnaA protein of *Escherichia coli*: abundance, improved purification, and membrane binding. *J. Biol. Chem.* **263**: 7136-7140
73. Skarstad, K., A. Løbner-Olesen, T. Atlung, K. von Meyenburg and E. Boye. (1989) Initiation of DNA replication in *Escherichia coli* after overproduction of the DnaA protein. *Mol. Gen. Genet.* **218**: 50-56
74. Sugimoto, K., A. Oka, H. Sugizaki, M. Takanami, A. Nishimura, S. Yasuda and Y. Hirota. (1979) Nucleotide sequence of *Escherichia coli* K-12 replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 575-579
75. Tippe-Schindler, R., G. Zahn and W. Messer. (1979) Control of the initiation of DNA replication in *Escherichia coli*: Negative control of initiation. *Mol. Gen. Genet.* **168**: 185-195
76. Torry, T. A. and T. Kogoma. (1982) Suppressor mutations (*rin*) that specifically suppress the *recA*⁺ dependence of stable DNA replication in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **187**: 225-230
77. Torry, T. A. and T. Kogoma. (1987) Genetic suppression of constitutive stable DNA replication in *rmh* mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **208**: 420-427
78. Van Dyk, T. K., A. A. Gatenby and R. A. LaRossa. (1989) Demonstration by genetic suppression of interaction of GroE products with many proteins. *Nature*. **342**: 451-453
79. von Meyenburg, K. and F. G. Hansen. (1987) "Regulation of chromosome replication." in: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. F.C. Neidhart, I.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umberger (ed.) Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C.
80. Wang, Q. and M. Kaguni. (1987) Transcriptional repression of the *dnaA* gene of *Escherichia coli* by dnaA protein. *Mol. Gen. Genet.* **209**: 518-525
81. Xu, Y.-C. and H. Bremer. (1988) Chromosome replication in *Escherichia coli* induced by oversupply of DnaA. *Mol. Gen. Genet.* **211**: 138-142
82. Yamaguchi, K. and J.-I. Tomizawa. (1980) Establishment of *Escherichia coli* cells with an integrated high copy number plasmid. *Mol. Gen. Genet.* **178**: 525-533

83. Yanish-Perron, C., J. Viera and J. Messing. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. **33**: 103-119
84. Yasuda, S. and Y. Hirota. (1977) Cloning and mapping of the replication origin of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **74**: 5458-5462
85. Yung, B. Y.-M. and A. Kornberg. (1988) Membrane attachment activates dnaA protein, the initiation protein of chromosome replication in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**: 7202-7205
86. Zyskind, J. W. and D. W. Smith. (1986) The bacterial origin of replication, *oriC*. *Cell*. **46**: 489-490

謝辞

研究活動において「一人」であることに対しては慎重な考慮が必要とされるものである。利点も大きい、その利点に行き着くまでの基礎を作る過程では妨げともなる。そして、そのような状態に至ったと思われた後でも、意外な危険に出会う。

5年の間に、表に出ようと出まいと、力となってくれた人達すべてに感謝していることをここに記す。

1990年 盛夏